

Anti-arthritis Activity of *Artemisia princeps* Pampanini on Complete Freund's Adjuvant-induced Arthritis

Ha-Rim Kim, Sol Kim and Seon-Young Kim*

Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

Received April 5, 2021 / Revised August 18, 2021 / Accepted August 18, 2021

Artemisia princeps Pampanini is an herbal medicine widely used to immune function-related diseases, such as anti-oxidative, anti-inflammatory, and antibacterial agents. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of AP extract and underlying mechanisms were evaluated in RAW 264.7 cells. The effects of AP extract were also studied in a complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation mouse model. In RAW 264.7 cells, AP extracts significantly inhibited the LPS-induced nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 protein expression. The LPS-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B was also significantly blocked by AP extract in RAW 264.7 cells. Oral administration of AP extract suppressed the increase in mouse paw edema and spleen index compared to CFA-treated mice group. Histologically, the infiltration of inflammatory cells was increased in cartilage and synovium in the CFA-treated mouse group, whereas it was suppressed in the AP extract-administered group. Furthermore, AP extract treatment significantly reduced the inflammatory cytokine, tumor necrosis factor- α , levels in CFA and LPS-treated mouse. In conclusion, the anti-inflammatory and anti-arthritis effect of AP extract was confirmed in both *in vitro* and *in vivo* models, suggesting that *Artemisia princeps* Pampanini may be a candidate material for arthritis treatment.

Key words : *Artemisia princeps* Pampanini, anti-inflammatory, complete Freund's adjuvant, Rheumatoid arthritis, tumor necrosis factor- α

서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis, RA)은 자가 면역 염증 질환으로 활액의 염증과 혈관 증식, 염증 세포의 침윤 및 연골과 관절의 손상을 유발한다[28, 41]. 류마티스 관절염의 정확한 원인과 병인은 명확하지 않지만, 활막과 인접한 관절 조직에서 대식세포가 활성화되고[12, 38] 이때 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진하며 [16], 류마티스 관절염의 발병 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3].

그람 음성 박테리아의 세포벽의 구성 요소인 lipopolysaccharides (LPS)는 대식세포를 활성화시키는 능력을 가지고 있으며, 염증 모델을 확립하고 평가하는데 주로 이용되고 있다[29]. 활성화된 대식세포는 inducible NO synthase (iNOS)의 작용에 의해 L-arginine으로부터 많은 양의 산화질소(nitric

oxide, NO)를 생성하며, NO는 신경 전달, 염증 및 면역 조절을 포함한 다양한 생물학적 과정에 관여한다고 알려져 있다 [14, 33, 37]. 그러나 과도한 NO의 생산은 류마티스 관절염 및 자가 면역 질환과 같은 염증성 질환의 발병을 초래할 수 있으므로, NO 생산의 저해는 염증성 질환 치료제 개발의 주요한 타겟이다[11, 13, 32].

LPS는 많은 염증 세포에서 발현되는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 활성화시키며, 특정 전사 인자의 인산화 및 활성화에 의해 유도된다[6, 20]. MAPKs는 염증 반응과 면역 반응을 조절하며[2], MAPKs 신호 전달 경로는 대식 세포에서 cyclooxygenase (COX)-2 와 iNOS 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다[23, 40]. 또한 nuclear factor (NF)- κ B 경로의 활성화는 MAPKs 경로의 활성화가 영향을 미치며[42], NF- κ B는 면역 및 염증 반응에 관여하여 다양한 세포 유전자를 조절하는 가장 중요한 전사 인자로 알려져 있다[27, 44].

류마티스 관절염의 현재 임상 치료에는 steroidal (SAIDs) 및 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)가 포함된다. 그러나 SAIDs와 NSAIDs의 장기간 사용은 위장 장애, 면역 결핍 및 체액성 장애를 포함하는 심각한 부작용을 초래하고 있어[18], 최근 수십 년 동안 임상적으로 사용이 가능한 더 안전하고 강력한 항염증제 개발을 위한 노력이 증가하고 있으며, 특히 천연물에 대한 연구가 지속되고 있다.

*Corresponding author

Tel : +82-63-711-1053, Fax : +82-63-711-1051

E-mail : seon02@jami.re.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.

*Artemisia*는 한국, 일본 및 중국의 동아시아 국가에서 차, 식품 및 전통 의학에 사용되는 천연 허브 식물이다. *Artemisia* 속의 변종인 *Artemisia princeps* Pampanini (AP)는 전통적으로 산통, 설사, 궤양, 통증 완화에 사용되어 왔으며[39], 한국 서해안에 위치한 강화(Ganghwa County)에서 재배되고 있다. 이것은 특히 다른 지역에 비해서 eupatilin, jaceosidin과 같은 플라보노이드의 함량이 높다고 보고되어 있다[17]. 또한, AP 추출물은 세포 사멸 유도를 통한 항암 효과[35, 36], 위궤양 완화[24], p38 MAPK과 NF- κ B 경로의 조절을 통한 라디칼 소거 효과[21], 항당뇨 및 항 알레르기 작용[26], 항염증제, 항산화제 등의 연구 결과가 보고되고 있다[25]. 그러나 인간 류마티스 관절염과 매우 유사한 관절염 모델에서 AP의 항염증 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. Complete Freund's adjuvant (CFA)는 자가면역질환을 유도하는데 사용되는 보조제로, 병리학적 형태의 관절염을 유발하는 것으로 알려져 있다[9].

따라서 본 연구는 AP 추출물이 CFA로 유도한 관절염 동물 모델에서 잠재적인 항염증 치료 효과를 갖는지 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 연구에서 세포 배양에 사용한 Dulbecco's-modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Gibco, USA)에서 구입하여 사용하였다. Mouse TNF- α ELISA kit는 R&D system (Abingdon, UK)에서 구입하였다. 단백질 발현 분석에 사용한 anti-iNOS, anti-COX-2, anti-phospho-NF κ B, anti-NF κ B, anti-phospho-I κ B α , anti-I κ B α , anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-SAPK/JNK, anti-SAPK/JNK, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2 및 anti- β -Actin 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 평가에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 lipopolysaccharides (LPS) 시약은 Sigma (MO, USA)에서 구입하였으며, 그 이외 모든 시약은 특급을 사용하였다.

추출물 제조

본 연구에 사용된 강화사자발쑃(*Artemisia princeps* Pampanini, AP)은 강화도에서 구입하여 지상부를 사용하였다. 강화사자발쑃 추출물을 얻기 위해 건조된 강화사자발쑃을 마쇄한 후, 10배수의 methanol에 침지 하여 상온에서 24시간 추출하였다. 추출 완료 후, 여과지(0.45 μ m)로 감압 여과한 추출물을 감압 농축하고 동결건조기(FDU-2100, EYELA, Japan)로 건조하여 분말 형태로 회수하였다. 회수한 추출물은 -80°C에서 보관하

였다. 실험 진행 시 추출물은 DMSO에 용해하여 사용하였다.

세포배양

본 연구에 사용한 마우스 대식세포주(RAW 264.7)는 미국 세포주 은행(ATCC, American Tissue Culture Collection, USA)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS과 100 unit/ml의 페니실린, 100 mg/ml의 스트렙토마이신으로 조성된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다[31]. RAW264.7 세포를 96-well plates에 1×10^5 cells/ml로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, AP 추출물을 농도별로 처리하여 추가로 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5 mg/ml)을 가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, DMSO로 용해된 formazan을 microplate reader (Thermo Scientific, Germany)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조구에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

산화질소(nitric oxide, NO) 함량 측정

산화질소 함량은 안정화된 산화질소 산화물인 Nitrite 농도를 Griess 분석방법에 기반하여 다음과 같이 수행하였다[10]. RAW 264.7 세포를 6-well plate (1×10^6 cell/well)에 분주하여 24시간 배양한 후, AP 추출물을 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤에 LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 18시간 동안 반응시켰다. 세포 배양액과 Griess 시약[Griess reagent, 1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5 % phosphoric acid solution]을 동량으로 혼합하고 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 산화질소 함량은 sodium nitrate (NaNO₂)로 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

Western blot을 통한 단백질 발현 분석

추출물과 LPS를 처리하고 18시간 후 세포를 수집하여 ice-cold RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 120 mM sodium chloride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin)을 첨가하여 30분간 lysis시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 상등액은 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 20 μ g의 lysate를 8 or 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)으로 transfer한 후, 항체와

단백질 간의 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 실온 1시간 동안 교반 하였다. 일차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight (anti-β-Actin은 1:10,000, 그리고 그 외 다른 항체는 1:2,500으로 blocking buffer에 희석) 반응시킨 후, 이차항체(anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG linked with horseradish peroxidase, SantaCruz Biotechnology)를 실온에서 2시간 동안 부착시켰다. Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 사용하여 Gel Documentation chemiluminescent imaging system (Amersham imager 600, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 단백질 발현을 확인하였다. 상대적 단백질 발현량은 Image J software program (National Institute of Health, USA)을 사용하여 정량하였다.

실험 동물 및 Adjuvant 유발 관절염 모델 제작

Adjuvant 유발 관절염 모델에서 AP추출물의 효능을 분석하기 위해 C57BL/6J 수컷 마우스(5주령, male)를 다물사이언스(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 1주간 사육 환경에 적응시킨 후, 정상군(Normal, N)과 관절염 유발군(CFA), AP추출물 처리군으로 분류하였다. 실험 동물은 식이와 식수를 자유롭게 섭취하였으며, 온도는 25±2°C, 상대습도는 55±5%로 유지시켰고, 명암은 12시간 주기로 자동조절 되도록 하였다. 본 실험은 (재)전주농생명소재연구원 동물 실험 윤리위원회의 승인(JAMI IACUC2017002)을 받아 수행하였다.

Adjuvant 유발 관절염 모델은 마우스 왼쪽 발바닥에 mineral oil (Sigma, MO, USA)로 10 mg/ml의 농도로 용해시킨 complete Freund's adjuvant (CFA) [containing 5.0 mg of dry, heat-killed Mycobacterium tuberculosis, Sigma, MO, USA]를 0.02 ml 피하주사하여 유도하였다. 관절염을 유도한 날부터 21일 동안 AP 추출물(300 mg/kg)을 1일 1회 경구투여 하였으며, 정상군과 대조군은 동시에 동일한 양의 증류수를 경구 투여하였다. CFA로 관절염을 유도하고 21일간의 실험 종료 후, 비장을 적출하여 무게를 측정하였다. 비장지수는 비장의 무게에 대한 체중의 비로 계산하였다[45].

조직 분석

적출된 관절 조직을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시키고, 파라핀으로 포매한 후 4 μm의 두께로 절편된 조직을 slide glass에 부착시켜 xylene 용액으로 탈파라핀화 한 후 100, 90, 80, 70% 에탄올로 탈수하였다. Hematoxylin & Eosin (H & E)으로 염색 후 현미경으로 관찰하였다(Olympus, Tokyo, Japan).

부종(paw edema) 측정

뒷다리 부종은 callipers (HANDO, China)를 사용하여 관절염 유발 전후의 좌측 후지의 직경(mm)을 각각3회 측정하여 평균 값을 구하였다.

생체 내(in vivo) TNF (tumor necrosis factor)-α 분석

생체 내 TNF-α 분석은 Kang의 방법을 변형하여 측정하였다[19]. 24시간 절식한 마우스에 AP 추출물을 경구투여 하고 15분 후 LPS를 복강 투여하여 90분간 반응시킨 후 혈액을 채취하였다. 마우스 혈청 내 TNF-α 수준은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 제조사의 지침에 준하여 실험을 수행하였다.

통계분석

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, 통계적 분석은 Sigma-plot program (v14.0, San Jose, CA, USA)을 이용하였고, 유의성 검정은 ANOVA (one-way analysis of variance) 및 Duncan's Multiple Comparison Test를 이용하여 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

AP 추출물의 세포 독성 평가 및 NO (nitric oxide) 생성 억제 효능

AP 추출물의 세포 독성은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. AP 추출물을 각각 0.1, 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μg/ml 농도로 24시간 RAW264.7 세포에 처리하였다(Fig. 1A). AP 추출물을 처리하지 않은 대조군(Blank)과 AP 추출물을 100 μg/ml 농도까지 처리한 실험군 사이의 세포 생존율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 250 μg/ml 농도의 AP 추출물은 세포 생존율을 약 40% 감소시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 RAW 264.7 세포에서 세포 독성이 없는 AP 추출물의 4 가지 농도(0.1, 1, 10 및 25 μg/ml)를 결정하여 다음 실험을 수행하였다.

AP 추출물의 NO 생성 억제 효능을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS (1 μg/ml)를 처리하여 관찰한 결과, LPS는 NO의 함량을 약 32배 증가시켰으나 AP 추출물에 의해 농도의존적으로 NO의 함량이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 1B).

AP의 iNOS (inducible NO synthase) 및 COX (cyclooxygenase)-2 발현에 미치는 영향

본 연구에서 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 정도를 western blot으로 관찰한 결과, LPS에 의한 자극이 주어지지 않은 상태의 RAW 264.7 세포에서는 iNOS 및 COX-2 모두 단백질 발현이 거의 되지 않았으나, LPS 자극에 의하여 현저하게 증가하였다. 또한 LPS에 의해 증가한 iNOS와 COX-2 단백질 발현은 AP 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2C, D). 결과적으로 AP 추출물의 NO 생성 억제와 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성은 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 AP 추출

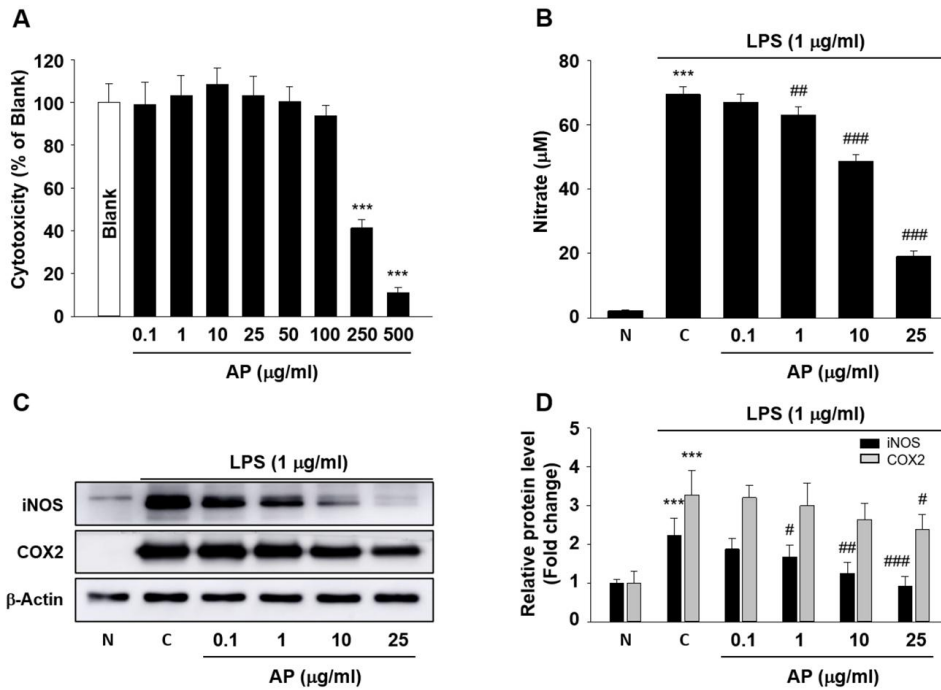


Fig. 1. Effects of AP extract on NO production and iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW264.7 macrophages. (A) Cytotoxicity of AP extract in RAW 264.7 cells. Different concentrations of AP extract (0.1-500 µg/ml) were treated for 24 hr, and then cell viability was measured by MTT assay. RAW264.7 cells were pretreated with AP (0.1, 1, 10 and 25 µg/ml) for 1 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 18 hr. (B) NO production was assayed for measure the accumulation of nitrite in culture medium. The protein expression of (C) iNOS and COX-2 was examined by Western blotting. The densitometry data represent are shown as relative density of protein bands normalized to β-Actin level. *** $p < 0.001$ vs. Blank or N; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. C (CON). Values are expressed mean ± SD of the three independent experiments.

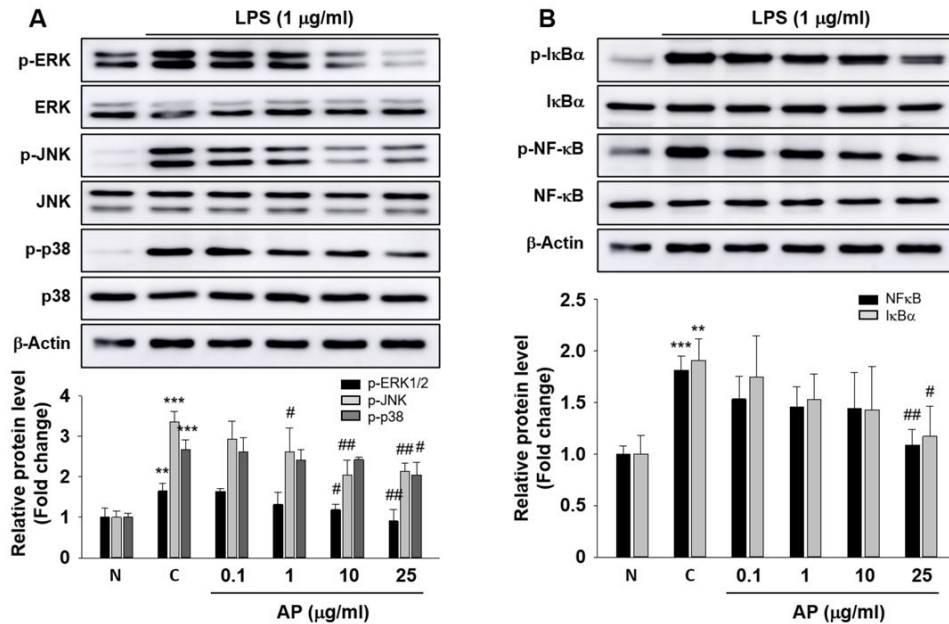


Fig. 2. Effects of AP extract on the activation of MAPK and NF-κB signaling pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophages. The phosphorylation levels of (A) MAPK including ERK, JNK, and p38, and (B) NF-κB, including IκBα and NF-κB, were determined by Western blotting. The densitometry data represent are shown as relative density of protein bands normalized to β-Actin level. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. N; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. C (CON). Values are expressed mean ± SD of the three independent experiments.

물이 산화적 스트레스에 의해 유도된 염증 매개 물질을 조절하여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 억제시키고, NO 생성 억제에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

AP 추출물의 MPAKs (Mitogen-activated protein kinase) 및 NF (nuclear factor)-κB 신호 전달 경로 저해 효능

AP 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위해 western blot을 사용하여 RAW 264.7 세포에서 MAPK 경로의 단백질 인산화를 관찰하였다. 그 결과 AP 추출물은 t-ERK, JNK 및 p38 수준에는 영향을 미치지 않으면서 농도 의존적으로 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 유도하였다. 본 연구에서 NF-κB 신호 전달 경로의 인산화를 평가한 결과, AP 추출물은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NF-κB와 IκBα 인산화를 증가시켰으며, 이는 NO 생성 결과와 iNOS, COX-2 및 MAPK 신호 전달 경로의 단백질 발현 결과 일치하였다. 따라서 AP 추출물은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPK 및 NF-κB 인산화를 억제하여 항염증 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

AP 추출물의 Adjuvant 유발 관절염 개선 효능

AP 추출물이 다리의 부종과 같은 형태학적인 염증 반응에 어떠한 효과를 나타내는지 확인하기 위해 마우스에 complete

Freund's adjuvant (CFA)로 관절염을 유발시켜 실험을 수행하였다. CFA로 유발된 류마티스 관절염에 AP 추출물을 경구 투여하여 관찰한 결과, 정상군과 비교하여 CFA 처리군에서 paw edema가 현저히 증가 되었다(Fig. 3A). CFA 처리 후 부종이 최대로 증가했을 때의 paw edema를 측정한 결과 CFA군에 비해 AP 추출물 투여군에서 부종이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3B). Synovium 내 염증세포 침윤 증가에 대한 AP 추출물의 개선 효능을 관찰하기 위해 마우스 관절 조직을 hematoxylin & eosin 염색 후 그 정도를 관찰하였다. 그 결과, 정상군에 비해 CFA군의 synovium에 염증세포 침윤이 증가되는 것을 관찰하였으며, 이는 AP 추출물에 의해 유의적으로 개선되는 것을 확인하였다(Fig. 3C). 또한 AP 추출물의 비장 지수 변화에 미치는 영향을 비교한 결과 정상군에 비해 CFA군에서 비장 지수가 유의하게 증가하였으며, AP 추출물 투여한 군에서는 감소한 것을 확인하였다.

AP 추출물의 TNF (tumor necrosis factor)-α 생성 억제 효능

본 연구에서는 AP 추출물에 의해 조절되는 TNF-α 생성량을 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서 관찰하였다. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 TNF-α 생산에 대한 AP 추출물의 효과를

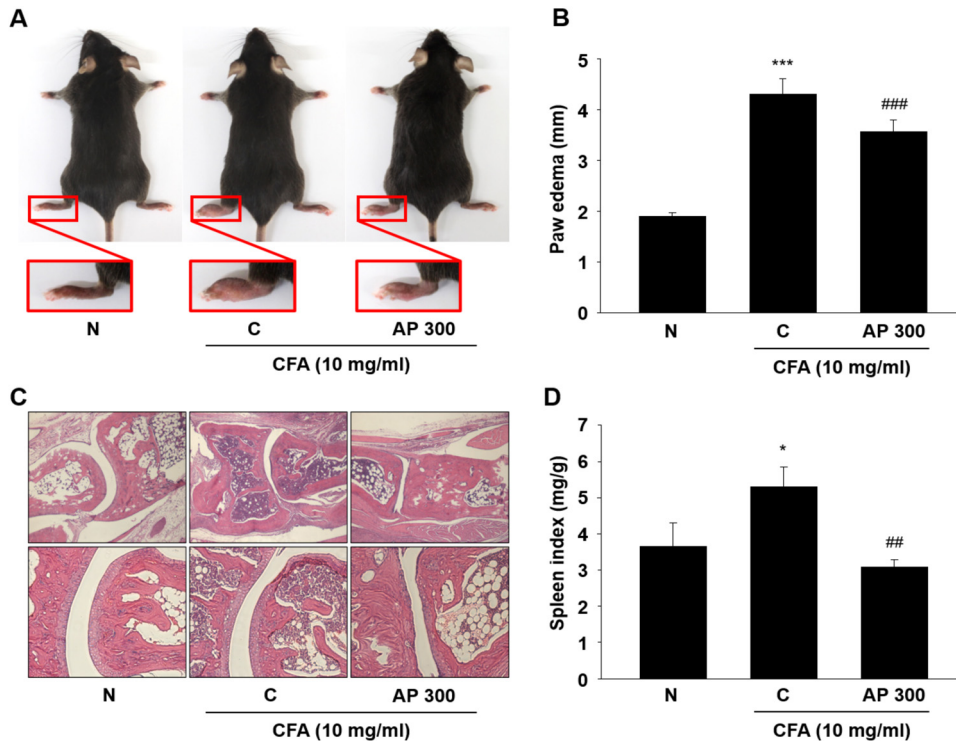


Fig. 3. Effects of AP extract on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in mice. (A) Representative images of arthritis mice. (B) Index of paw edema. (C) Representative H & E stained-image of joint tissue (upper panel, ×40; lower panel, ×100). (D) Adjuvant-induced arthritis in mice were induced by Mycobacterium tuberculosis into the plantar surface of the left hind paw, and then administrated with AP 300 mg/kg during for 21 days. The ratio of spleen to body weight was calculated. ****p*<0.001 vs. N; ###*p*<0.001 vs. C (CON). Values are expressed mean ± SD of the three independent experiments.

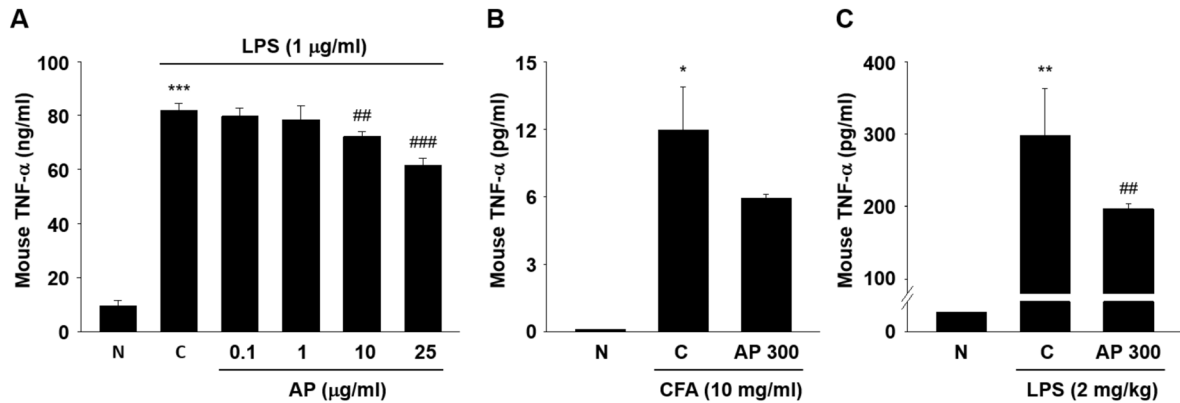


Fig. 4. Effects of AP on TNF- α production. (A) TNF- α levels were measured in RAW 264.7 macrophages culture medium, which were treated with LPS (1 μ g/ml) for 18 hr in the presence or absence of AP extract. TNF- α levels were measured in (B) Adjuvant-treated mice serum after AP 300 mg/kg treatment for 21 d and (C) LPS (2 mg/kg) treated mice serum after AP 300 mg/kg treatment for 15 min. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. N; ## p <0.01 and ### p <0.001 vs. C (CON). Values are expressed mean \pm SD of the three independent experiments.

조사한 결과, AP 추출물(10, 25 ng/ml)에 의해 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다(Fig. 4A). 21일 동안 CFA로 유발된 관절염 실험이 종료된 후, 마우스 혈청 내 TNF- α 생성량을 측정된 결과도 동일하게 관찰되었다(Fig. 4B). 또한 AP 추출물이 체내에서 그 효과를 발휘하는지 여부를 조사하기 위해 AP 추출물을 섭취한 마우스 복강에 LPS (2 mg/kg)를 투여하여 염증을 유발시킨 후 체내 TNF- α 생성량을 조사하였다. 그 결과 마우스 혈청의 TNF- α 수준은 LPS 유도 마우스에서 유의하게 증가하였으며, AP 추출물 투여에 의해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4C).

고 찰

사자발쑃(*Artemisia princeps* Pampanini, AP)은 강화도에서 자생하는 다년생 초본으로 한의학적으로 간기능개선, 항산화, 항염증, 항균 등의 효능이 있는 것으로 알려졌다[43]. AP의 생리활성 물질은 cineole, camphor, borneol, eupatilin, jaceosidin, eupafolin, epiogenin, sitosterol, ergosterol, stigmasterol 등이 있다[5, 34]. 최근 다수의 연구에 따르면 AP 추출물과 주요 성분의 항산화, 항염증, 혈당개선, 항비만, 항혈전, 천식 억제, 암세포 사멸 등 다양한 생리활성이 보고되었다[4, 15, 17, 22, 43]. 이러한 배경에서 본 연구에서는 AP 추출물의 자가면역 염증성 질환인 류마티스 관절염에 대한 효과를 평가하기 위해 LPS로 유도된 대식세포 염증개선 기전과 류마티스 관절염 마우스 모델에서 부종 개선 및 염증 유발 인자 억제능을 분석하였다.

대식세포에서 NO 생성과 관련 있는 염증성 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 수준은 염증 정도를 평가하는 중요한 지표로 알려져 있다[13]. 대식세포에서 ERK 1/2, p38 및 JNK/SAPK와 같은 MAPK에 의해 염증 유발 인자의 생성이 촉진된

다[2]. 또한, MAPK 신호전달 인자의 활성화는 NF- κ B와 같은 여러 전사 인자의 활성화를 유발한다[20]. 강화사자발쑃 추출물과 생리활성 성분이 대식세포에서 LPS에 의한 IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하고 I κ B α 분해 및 인산화를 활성화하여 NF- κ B의 전사 활성을 조절함으로써 대식세포 내 염증 반응을 조절한다고 보고되었다[7, 22].

본 연구에서도 이전 보고 결과와 마찬가지로 AP 추출물이 대식세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현, MAPKs 및 NF- κ B의 인산화를 억제시키는 것이 확인하였다.

류마티스 관절염은 염증 반응에 의한 관절 손상으로 병리학적으로 부종이 증가하는 것으로 알려져 있다[1, 16]. 본 연구에서는 complete Freund's adjuvant (CFA)로 유도된 마우스 관절염 모델에서 AP 추출물이 부종 등 형태학적인 염증 반응에 대한 효과를 평가하였다. CFA는 다발성 관절염 및 비장과 부신의 증대 등을 유발하는 것으로 보고되었다[45]. AP 추출물을 CFA로 유도된 염증성 류마티스 관절염 마우스 모델에 투여한 결과 혈청 TNF- α 생성 억제와 paw edema, synovium 내 염증세포 침윤을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 세포는 물론 동물수준에서 LPS에 의한 TNF- α 증가를 AP 추출물이 유의하게 억제함을 확인할 수 있었다. 최근 보고에 따르면 TNF- α 의 생성은 관절 손상에 주요한 인자로 보고되었다[19]. 따라서 TNF- α 와 같은 염증성 cytokine은 synovium의 염증 및 파골 세포의 분화를 결정적으로 유도하므로 류마티스 관절염 치료 효과의 지표로 사용되고 있다.

결론적으로 AP 추출물은 LPS에 의한 대식세포 활성화와 TNF- α 의 증가는 물론 adjuvant에 의한 염증 증가와 관련 기전을 조절하였다. 이는 사자발쑃이 류마티스 관절염 치료 연구의 기능성 소재로 활용될 수 있음을 시사하는 결과이다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahn, B. Z., Yoon, Y. D., Lee, Y. H., Kim, B. H. and Sok, D. E. 1998. Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action: screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion. *Planta Med.* **64**, 220-224.
- Ajizian, S. J., English, B. K. and Meals, E. A. 1999. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J. Infect. Dis.* **179**, 939-944.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. and Romagnani, S. 2009. Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 325-331.
- Bae, E. A., Min, S. W., Lee, B., Kim, N. J., Baek, N. I., Han, E. J., Chung, H. G. and Kim, D. H. 2007. Antiasthmatic effect of fermented Artemisia princeps in asthmatic mice induced by ovalbumin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1554-1557.
- Bang, M., Kim, D., Yoo, J., Lee, D., Song, M., Yang, H., Jeong, T., Lee, K., Choi, M. and Chung, H. 2005. Isolation and identification of flavonoids from the aerial parts of Sajabalssuk (*Artemisia herba*). *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 418-420.
- Chan, E. D. and Riches, D. W. 2001. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**, C441-C450.
- Chen, C. C., Lin, M. W., Liang, C. J. and Wang, S. H. 2016. The anti-inflammatory effects and mechanisms of Eupafolin in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *PLoS One* **11**, e0158662.
- Chen, Y., Wang, Q. W., Zuo, J., Chen, J. W. and Li, X. 2017. Anti-arthritis activity of ethanol extract of *Claoxyton indicum* on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **17**, 11-17.
- Colpaert, F. C. 1987. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain* **28**, 201-222.
- Eigler, A., Moeller, J. and Endres, S. 1995. Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7. *J. Immunol.* **154**, 4048-4054.
- Evans, C. H. 1995. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions Suppl.* **47**, 1071-116.
- Garcia-Carbonell, R., Divakaruni, A. S., Lodgi, A., Vicente-Suarez, I., Saha, A., Cheroute, H., Boss, G. R., Tiziani, S., Murphy, A. N. and Guma, M. 2016. Critical role of glucose metabolism in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1614-1626.
- Grosjean, S. A., Arstall, M. A., Mitchell, R. N., Klappacher, G. W., Kelly, R. A., Pfeffer, M. A. and Pfeffer, J. M. 1999. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor in animal models of myocardial necrosis induced by coronary artery ligation or isoproterenol injection. *J. Card. Fail.* **5**, 236-245.
- Ialenti, A., Iannaro, A., Moncada, S. and Di Rosa, M. 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **211**, 177-182.
- In, M. J., Kim, K. H. and Kim, D. C. 2020. Antioxidant and anticoagulant activities of Ganghwa medicinal mugwort (*Artemisia princeps* Pampanini) extract. *J. Appl. Biol. Chem.* **63**, 439-442.
- Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F. and Gabay, C. 2006. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam. Horm.* **74**, 371-403.
- Jung, U. J., Baek, N. I., Chung, H. G., Bang, M. H., Yoo, J. S., Jeong, T. S., Lee, K. T., Kang, Y. J., Lee, M. K., Kim, H. J., Yeo, J. Y. and Choi, M. S. 2007. The anti-diabetic effects of ethanol extract from two variants of *Artemisia princeps* Pampanini in C57BL/KsJ-db/db mice. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2022-2029.
- Kalden, J. R. 2002. Expanding role of biologic agents in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* **66**, 27-37.
- Kang, J. S., Kim, H. M., Choi, I. Y., Han, S. B., Yoon, Y. D., Lee, H., Park, K. H., Cho, I. J., Lee, C. W., Lee, K., Lee, K. H. and Park, S. K. 2010. DBM1285 suppresses tumor necrosis factor alpha production by blocking p38 mitogen-activated protein kinase/mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 signaling pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 657-664.
- Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H., Park, H. I., Sung, J. M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K. C. and Kim, T. W. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol.* **545**, 192-199.
- Kim, J. H., Jung, S. H., Yang, Y. I., Ahn, J. H., Cho, J. G., Lee, K. T., Baek, N. I. and Choi, J. H. 2013. Artemisia leaf extract induces apoptosis in human endometrial cells through regulation of the p38 and NFkappaB pathways. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 767-775.
- Kim, K. J., Kim, M. S., Seok, P. R., Shin, J. H. and Kim, J. Y. 2019. Antithrombotic effect of *Artemisia princeps* Pampanini extracts *in vitro* and in FeCl3-induced thrombosis rats. *J. Food Sci.* **84**, 3037-3044.
- Kim, K. N., Heo, S. J., Yoon, W. J., Kang, S. M., Ahn, G., Yi, T. H. and Jeon, Y. J. 2010. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **649**, 369-375.
- Kim, M. J., Kim, D. H., Na, H. K., Oh, T. Y., Shin, C. Y. and Surh, Y. J. 2005. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis

- in human gastric cancer (AGS) cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **24**, 261-269.
25. Kim, T. H., Lee, S. J., Rim, H. K., Shin, J. S., Jung, J. Y., Heo, J. S., Kim, J. B., Lee, M. S. and Lee, K. T. 2013. *In vitro* and *in vivo* immunostimulatory effects of hot water extracts from the leaves of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *J. Ethnopharmacol.* **149**, 254-262.
 26. Lee, C. H., Jeong, T. S., Choi, Y. K., Hyun, B. H., Oh, G. T., Kim, E. H., Kim, J. R., Han, J. I. and Bok, S. H. 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 681-688.
 27. Li, Q. and Verma, I. M. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725-734.
 28. Liu, Q., Xiao, X. H., Hu, L. B., Jie, H. Y., Wang, Y., Ye, W. C., Li, M. M. and Liu, Z. 2017. Anhuienoside C ameliorates collagen-induced arthritis through inhibition of MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Front. Pharmacol.* **8**, 299.
 29. Sung, J. S., Davaatseren, M., Kim, W., Park, S. K., Kim, S. H., Hur, H. J., Kim, M. S., Kim, Y. S. and Kwon, D. Y. 2009. Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 319-323.
 30. Min, S. W., Kim, N. J., Baek, N. I. and Kim, D. H. 2009. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *J. Ethnopharmacol.* **125**, 497-500.
 31. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
 32. O'Shea, J. J., Ma, A. and Lipsky, P. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 37-45.
 33. Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G. and Packer, L. 2000. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* **465**, 93-97.
 34. Ryu, S. N., Kang, S. S., Kim, J. S. and Ku, B. I. 2004. Quantitative analysis of eupatilin and jaceosidin in *Artemisia herba*. *Kor. J. Crop Sci.* **49**, 452-456.
 35. Sarath, V. J., So, C. S., Won, Y. D. and Gollapudi, S. 2007. *Artemisia princeps* var *orientalis* induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *Anticancer Res.* **27**, 3891-3898.
 36. Seo, H. J., Park, K. K., Han, S. S., Chung, W. Y., Son, M. W., Kim, W. B. and Surh, Y. J. 2002. Inhibitory effects of the standardized extract (DA-9601) of *Artemisia asiatica* Nakai on phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity, papilloma formation, cyclooxygenase-2 expression, inducible nitric oxide synthase expression and nuclear transcription factor kappa B activation in mouse skin. *Int. J. Cancer* **100**, 456-62.
 37. Stichtenoth, D. O. and Frolich, J. C. 1998. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 246-257.
 38. Tang, M. W., Reedquist, K. A., Garcia, S., Fernandez, B. M., Codullo, V., Vieira-Sousa, E., Goffin, V., Reuwer, A. Q., Twickler, M. T., Gerlag, D. M. and Tak, P. P. 2016. The prolactin receptor is expressed in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis synovial tissue and contributes to macrophage activation. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 2248-2259.
 39. Trinh, H. T., Lee, I. A., Hyun, Y. J. and Kim, D. H. 2011. *Artemisia princeps* Pamp. Essential oil and its constituents eucalyptol and alpha-terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF-kappaB activation. *Planta Med.* **77**, 1996-2002.
 40. Uto, T., Fujii, M. and Hou, D. X. 2005. 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate suppresses inducible nitric oxide synthase expression through the inhibition of Janus kinase 2-mediated JNK pathway in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1211-1221.
 41. Vincent, T. L., Williams, R. O., Maciewicz, R., Silman, A. and Garside, P. 2012. Arthritis Research UKamwg. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology (Oxford)* **51**, 931-941.
 42. Wang, J. X., Hou, L. F., Yang, Y., Tang, W., Li, Y. and Zuo, J. P. 2009. SM905, an artemisinin derivative, inhibited NO and pro-inflammatory cytokine production by suppressing MAPK and NF-kappaB pathways in RAW 264.7 macrophages. *Acta. Pharmacol. Sin.* **30**, 1428-1435.
 43. Yang, H. G., Kim, H. J., Kim, H. S. and Park, S. N. 2012. Antioxidative and antibacterial activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **40**, 250-260.
 44. Yun, K. J., Kim, J. Y., Kim, J. B., Lee, K. W., Jeong, S. Y., Park, H. J., Jung, H. J., Cho, Y. W., Yun, K. and Lee, K. T. 2008. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 431-441.
 45. Zuo, J., Xia, Y., Li, X. and Chen, J. W. 2014. Therapeutic effects of dichloromethane fraction of *Securidaca inappendiculata* on adjuvant-induced arthritis in rat. *J. Ethnopharmacol.* **153**, 352-358.

초록 : *Artemisia princeps* Pampanini의 complete Freund's adjuvant 유발 관절염에 대한 개선 효과

김하림 · 김솔 · 김선영*

(재단법인 전주농생명소재연구원)

강화사자발쑥(*Artemisia princeps* Pampanini)은 항산화, 항염증 및 항균제와 같은 면역 기능 관련 질병에 널리 사용되는 약초이다. 이 연구에서 우리는 RAW 264.7 세포에서 AP 추출물의 항염증 효과를 조사하고 관련 메커니즘을 평가하였다. AP 추출물의 효과는 complete Freund's adjuvant (CFA) 유도 관절염 및 lipopolysaccharide (LPS) 유도 마우스 모델에서도 평가되었다. RAW 264.7 세포에서 AP 추출물은 LPS에 의해 유도된 산화질소(NO) 생성과 inducible NO synthase 및 cyclooxygenase-2 단백질 발현을 현저하게 억제했다. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 mitogen-activated protein kinase와 nuclear factor- κ B의 인산화 또한 AP 추출물에 의해 유의하게 억제되었다. AP 추출물의 경구 투여는 CFA 처리 마우스 그룹에 비해 발의 부종 및 비장 지수 증가를 억제하였다. 조직학적으로 CFA 처리 마우스 군에서는 cartilage와 synovium에서 염증 세포의 침윤이 증가한 반면 AP 추출물 투여군에서는 억제되었다. 더욱이, AP 추출물은 염증성 사이토카인으로 알려진 tumor necrosis factor- α 수준을 CFA 및 LPS 처리 마우스 모델에서 현저하게 감소시켰다. 결론적으로, AP 추출물의 항염증 및 항 관절염 효과는 *in vitro* 및 *in vivo* 모델 모두에서 확인되었으며, 이는 *Artemisia princeps* Pampanini가 관절염 치료의 후보 물질이 될 수 있음을 시사한다.