



Effects of Fermented *Achyranthes japonica* Nakai, *Angelica gigas* Nakai, and *Eucommia ulmoides* Oliver Extracts on Regulation of Apoptosis in Articular Chondrocytes

Dakyung Kim¹ · Wonhee Jo¹ · Minhee Lee¹ · Hyun Cheol Jeong² · Sung-Jin Lee² · Seunghun Lee² · Jeongmin Lee^{1,3}

Primary Chondrocytes에서 발효우슬, 당귀, 두충 복합물의 세포사멸 조절 효과

김다경¹ · 조원희¹ · 이민희¹ · 정현철² · 이성진² · 이승훈² · 이정민^{1,3}

Received: 9 December 2022 / Accepted: 6 January 2023 / Published Online: 17 January 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract The effects of fermented *Achyranthes japonica* Nakai, *Angelica gigas* Nakai, and *Eucommia ulmoides* Oliver extracts (FAAE) on regulation of inflammation and apoptosis were investigated in primary cultured rat cartilage cells. To identify the protective effects of FAAE against H₂O₂, cell survival was measured by MTT assay. Smad3, Collagen type I, MMP3, and MMP13 were measured by real-time PCR and western blot and the inflammatory (NF-κB pathway, COX-2, iNOS) factors were determined by western blot. The apoptosis related factors (JNK, c-Fos, c-Jun, caspase 3, Bax, and Bcl-2) were determined by western blot. FAAE significantly increased the following: H₂O₂ treated cell survival, mRNA and protein expression of Smad 3, collagen type I. In addition, FAAE significantly decreased the

protein expression of inflammatory and apoptosis related factors. This study suggests that FAAE have a protection effect of chondrocytes through inhibition of inflammation and apoptosis. Thus, FAAE is a therapeutic potential food component in osteoarthritis.

Keywords *Achyranthes japonica* Nakai · *Angelica gigas* Nakai · Apoptosis · Chondrocytes · *Eucommia ulmoides* Oliver

서론

골관절염(osteoarthritis)은 연골의 점차적인 손실로 인한 염증성 질환으로 대표적인 만성 퇴행성 질환 중 하나로 2021년 건강보험심사평가원에서 발표한 통계에 따르면 70대가 가장 많은 비중을 차지하고 있는 것으로 보고되었다[1]. 관절연골에 존재하는 유일한 세포인 연골세포(chondrocyte)는 synovial fluid로부터 영양분과 외부 화학적 신호를 공급받아 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)을 생산 및 유지하는 역할을 한다. 그러나 노화 및 외부 자극에 의해 발생한 연골의 손실로 인해 관절강직(joint stiffness), 부종 및 통증이 발생하며, 연골에서 퇴행성 변화가 발생하게 되면 세포 외 기질이 감소하거나 파괴되고 연골세포 수가 감소하게 되는데 이는 세포자멸사(apoptosis)와 관련이 있다 [2,3]. 외부 자극에 대한 보호 작용을 하는 염증(inflammation)이 일어나는 동안 cyclooxygenase (COX)와 nitric oxide synthase (NOS)와 같은 생리활성물질과 염증성 사이토카인, 금속단백질

Jeongmin Lee (✉)
E-mail: jlee2007@khu.ac.kr

¹Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

²Biohealthcare R&D Center, Hyundaiabioland Co., Ltd., Ansan 15407, Republic of Korea

³Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

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.

분해효소(metalloproteinases, MMPs), 단백질 가수분해효소(proteolytic), 전사인자(nuclear factor kappa-chain enhancer of activated B cell, NF- κ B) 등이 생성된다[4,5]. 또한 과도한 염증 발생은 세포자멸사를 발생하게 하는데, 세포자멸사는 인체의 발생과정, 노화 및 항상성 유지에 가장 기본적이고 중요한 역할을 하는 것으로, 골관절염에서는 병리발생에 주요인자로 여겨진다[6]. 미토콘드리아에서 호흡으로 인해 발생하는 중간 대사 산물 중 하나인 H₂O₂는 과도하게 발생하게 되면 산화적 스트레스를 발생시키고, 세포벽의 구성 성분 중 하나인 lipopolysaccharide (LPS)는 세포를 자극하여 염증 매개인자들을 발현시키게 된다. 이러한 H₂O₂와 LPS는 세포 실험에서 염증 반응을 재현할 때 주로 쓰이는 물질이다[7,8]. 관절염을 치료하는 방법으로는 수술적 치료 및 약물적 치료가 있지만 합병증과 감염, 면역체계 약화, 인지장애, 과민반응 등과 같은 부작용의 위험이 나타나 인체에 안전하면서도 효능이 입증된 건강기능식품과 같은 대체의학에 대한 기호도 및 수요가 증가하고 있다[9-11].

우슬(*Achyranthes japonica* Nakai)은 한의학에서 골관절염 환자에게 사용되어 오는 약재로, inokosterone, oleanolic acid, saponin, ecdysone과 같은 성분이 골관절염 및 염증을 억제하는 효과가 있음을 많은 논문에서 보고되었다[12-14]. 당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 참당귀의 뿌리를 건조하여 사용하고, decursin이라는 성분이 항염증, 혈액 순환, 항암 등에 효과가 있는 약재이다[15]. 또한 두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)은 나무껍질을 말려 사용하며 lignan, phenol, seroid, iridoid, flavonoid 등과 같은 다양한 화학 성분을 함유하고 있고 이러한 성분들이 항염증, 항산화, 항균, 항암 등의 효과를 가지는 것으로 보고되어 있다[16,17]. 선행 연구를 통해 발효우슬, 당귀, 두충 추출복합물이 골관절염 유발 동물모델에서 염증성 사이토카인 (tumor necrosis factor alpha; TNF- α , interleukin-1 beta; IL- β , IL-6) 농도 감소, MMPs (MMP-3, MMP-7)의 발현 감소 등 항관절염 효과를 확인하였다[18,19].

본 연구에서는 primary chondrocyte를 이용하여 발효우슬, 당귀, 두충 추출 혼합물(FAAE)의 염증 및 세포자멸사(apoptosis)에 미치는 영향을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

추출 및 재료

본 연구에 사용된 발효우슬, 두충, 당귀 복합물(FAAE)은 (주)Hyndaibioland (Ansan, Korea)에서 제공받은 것으로 우슬의 뿌리는 4시간 동안 95°C에서 열수추출한 후 *Lactobacillus plantarum* 300 mL를 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 발효 후 적어도 14 brix로 농축시켰다. 당귀와 두충은 6시간 동안 95°C에서 열수추출하여 여과 후 농축시켰다. 제조조건 설정을 위해 다양한 비율 복합물의 비교 실험을 통해 확립된 우슬 : 당귀 : 두충 : β -cyclodextrin = 30:22:15:33의 비율로 각 추출물을 혼합하여 분무 건조시켜 분화화한 시료를 사용하였다[20].

연골세포 (chondrocyte) 분리 및 배양

연골세포 분리를 위해 Sprague-Dawley (SD) Rat (수컷, 5주령)을 (주)새론바이오(Uiwang-si, Korea)로부터 공급받았다. 호흡 마

Table 1 Primer sequences used in Real-time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
Smad3	F: 5'-CGC ATG AGC TTC GTC AAA GG-3'
	R: 5'-CCG ATC CCT TTA CTC CCA GTG-3'
Collagen Type I	F: 5'-GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA-3'
	R: 5'-CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA-3'
MMP-3	F: 5'-GAG TGT GGA TTC TGC CAT TGA G-3'
	R: 5'-TTA CAG CCT CTC CTT CAG AGA-3'
MMP-13	F: 5'-TGA TGG GCC TTC TGG TCT TCT-3'
	R: 5'-CCC CGC CAA GGT TTG G-3'
GAPDH	F: 5'-TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C-3'
	R: 5'-CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT-3'

취 기기(NORVAP, North Yorkshire, UK)와 이소플루란(Piramal Critical Care Inc, Bethlehem, PA, USA)을 사용하여 희생시킨 rat의 뒷다리 무릎관절 끝 부분의 연골을 1-2 mm 정도 얇게 채취하였다. 연골 세포 분리는 선행 연구[9]를 참고하여 진행하였고, 본 연구는 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다(KHGASP-22-276).

Cell viability 측정

96 well plate에 분리한 연골세포를 1×10^4 cells/well로 분주하고 overnight하여 안정화시킨 후 FAAE를 100, 200, 400 μ g/mL 농도로 처리한 후 24시간 배양하였고 그 후 200 μ M H₂O₂를 2시간 처리한 후 MTT 20 μ L씩 처리하여 최대 4시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. MTT 시약과 배지를 모두 제거 후 DMSO를 200 μ L씩 처리하여 540 nm에서 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Real-time polymerase chain reaction에 의한 유전자 발현 측정

6 well plate에 chondrocytes 세포를 5×10^5 cells/well씩 분주하고 안정화시킨 뒤 FAAE를 100, 200, 400 μ g/mL 농도로 처리하고, 200 μ M의 H₂O₂를 2시간 동안 처리하였다. RNA 추출 및 cDNA 합성, real-time PCR은 선행 연구[21]의 실험방법으로 진행하였다. 유전자 증폭 반응에 사용할 각각의 Primer 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 결과의 분석은 Bio-Rad에서 제공하는 CFX Maestro™ Analysis Software (Bio-Rad Laboratories)로 분석하였다.

Western blot에 의한 단백질 발현 측정

6 well plate에 chondrocytes 세포를 5×10^5 cells/well씩 분주하고 안정화시킨 뒤 FAAE를 100, 200, 400 μ g/mL 농도 처리하고 H₂O₂는 200 μ M의 농도로 2시간, LPS는 50 μ g/mL의 농도로 24시간 처리하였다. Western blot은 Kim 등[22]의 실험방법을 참고하여 진행하였다. 1차 항체 Smad3, p-Smad3, MMP's (3, 13), Collagen type I, I κ B α , p-I κ B α , p65, COX-2, iNOS, JNK, p-JNK, c-Fos, p-c-Fos, c-Jun, p-c-Jun, caspase 3, cleaved caspase 3, Bax, Bcl-2, beta-actin (Cell signaling Technology,

Beverly, MA, USA)를 사용하였고, horseradish peroxidase가 증합된 2차 항체(Cell signaling Technology)를 사용하였다. Enhanced chemiluminescent (ECL, Amershampharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용해 발색한 후 Easy photo를 사용하여 촬영하였다. 촬영된 western blot band 이미지들은 Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 band의 밀도를 측정하였다.

통계처리

본 실험 결과의 분석은 통계프로그램 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며, 각 실험 항목의 측정 결과를 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 그룹 간 평균 차이는 one-way ANOVA로 확인하였고 통계적 유의성은 Duncan's test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

H₂O₂ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제 효과

연골세포의 사멸억제와 세포재생은 골관절염에 있어서 가장 중요하게 여겨지고 있다. SD rat 관절에서 primary한 chondrocyte에 FAAE와 200 μM H₂O₂를 처리하여 세포사멸 억제 효과를 알아본 결과(Fig. 1A), H₂O₂만을 처리한 control (C)군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 normal control (NC)군에 비해 cell viability가 59.6% 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이는 H₂O₂에 의해 세포사멸이 나타났음을 의미한다. FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 cell viability는 C군에 비해 각각 45.6%, 73.7%, 104.5% 유의적으로 증가함을 확인하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 FAAE가 H₂O₂에 의해 나타나는 세포사멸을 억제하는 것을 의미한다.

H₂O₂ 산화적 독성에 의한 연골 생성 및 분해 관련 유전자 및 단백질 발현의 변화

Smad는 receptor regulated Smad (1, 2, 3, 5, 8)과 common partner Smad (4), inhibitory Smad (4,7)로 분류된다. Smad2/Smad3이 활성화되면 핵 내 전사인자의 활성화가 나타나고 그로 인해 collagen type 1의 생성이 촉진시킨다[23]. 연골조직에는 다양한 collagen type이 존재하는데 Collagen type 1은 연골 세포뿐만 아니라 인체 세포에서 가장 많이 존재한다. Matrix metalloproteinase (MMPs)는 정성 성장 및 골 손상 후 회복과정에서 중요한 역할을 하는 효소이지만 골관절염의 발생에서는 ECM 분해를 증가시키는 효소로 tissue inhibitor of MMPs (TIMPs)에 의해 억제되지만 과도한 염증이 발생하면 TIMPs가 억제되고 MMPs는 증가하게 된다. 따라서 관절염에서 MMPs의 억제는 연골 보호에 핵심적인 기전 중 하나이다. MMP3는 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 작용을 하는 금속단백분해효소이고, MMP13은 collagen type 2의 분해효소로 연골의 콜라겐 생성 및 재생에 중요한 인자이다[24].

SD rat에서 primary한 chondrocyte에 FAAE와 200 μM H₂O₂를 처리한 후 연골 생성(collagen type 1, Smad3) 및 분해

(MMP3, MMP13) 관련 유전자 및 단백질 발현 변화를 측정하였다. 연골 생성 인자인 Smad3 mRNA 발현량의 변화는 H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 감소하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 증가하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 1B, $p < 0.05$). Collagen type 1 mRNA 발현량의 변화는 H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 감소하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 증가함을 확인하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 1C, $p < 0.05$). p-Smad3/Smad3 단백질 발현량의 변화를 확인한 결과, H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적 감소하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 증가하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 2B, $p < 0.05$). Collagen type 1 단백질 발현량의 변화를 확인한 결과, H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 감소하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2C, $p < 0.05$).

연골 분해 인자인 MMP3 mRNA 발현량의 변화는 H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 감소하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 1D, $p < 0.05$). MMP13 mRNA 발현량의 변화는 H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 감소하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 1E, $p < 0.05$). MMP3 단백질 발현량의 변화를 확인한 결과, H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 증가하였다. FAAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FAAE 200, FAAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 2D, $p < 0.05$). MMP13 단백질 발현량의 변화를 확인한 결과, H₂O₂만을 처리한 C군에서 H₂O₂를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2E, $p < 0.05$). 이상의 실험 결과에 따라 H₂O₂산화적 독성에 의해 발생한 연골의 생성 관련 인자 억제 및 분해 관련 인자 증가가 FAAE에 의해 연골 생성 인자를 증가시키고, 분해 관련 인자를 억제시켜 연골 세포 보호 효과가 있을 것으로 생각된다.

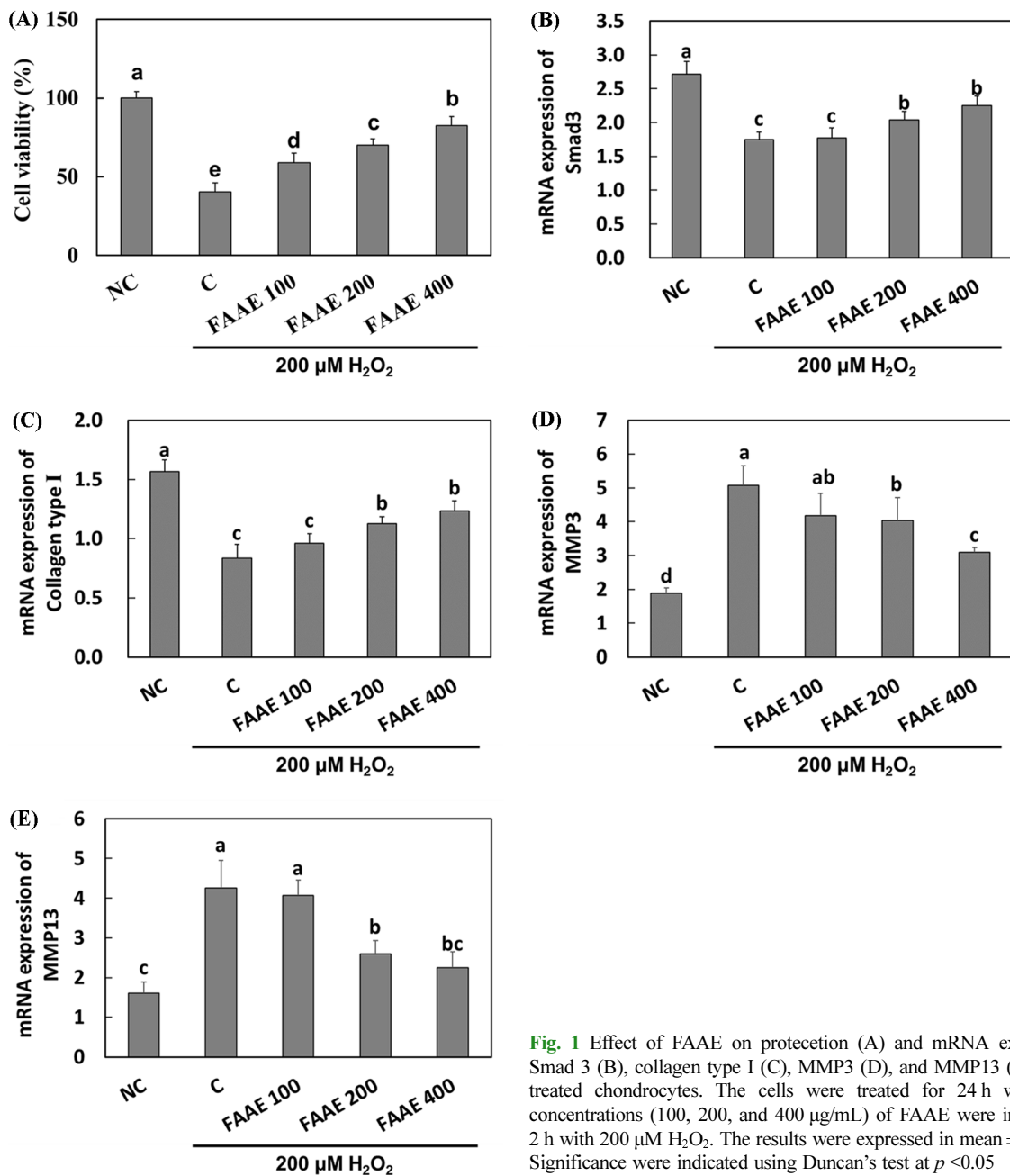


Fig. 1 Effect of FFAE on protection (A) and mRNA expression of Smad 3 (B), collagen type I (C), MMP3 (D), and MMP13 (E) in H₂O₂-treated chondrocytes. The cells were treated for 24 h with various concentrations (100, 200, and 400 μg/mL) of FFAE were incubated for 2 h with 200 μM H₂O₂. The results were expressed in mean ± SD values. Significance were indicated using Duncan’s test at *p* < 0.05

LPS에 의한 염증 관련 인자 단백질 발현 변화

LPS는 toll-like receptor (TLR) 4에 의해 인식되는 박테리아 내 독소로, 세포실험에서 염증실험에서 주로 쓰이는 물질이다. TLR4에 의해 LPS가 인식되어 전달된 활성화 신호는 inhibitor κB (IκB) kinase (IKK)를 통해 IκB와 p65를 인산화시켜 NF-κB를 활성화시킨다. 활성화된 NF-κB는 핵 내로 이동하여 케모카인, 염증성 사이토카인, inducible NOS (iNOS), COX-2와 같은 효소의 유전자 발현을 증가시켜 염증반응을 유발시킨다. 또한 LPS는 L-arginine으로부터 NO를 생성하는 iNOS 발현을 직접적으로 증가시켜 염증 반응을 유발하기도한다[25].

SD rat에서 primary한 chondrocyte에 FFAE와 LPS를 처리한

후 염증 관련 단백질 발현 변화를 측정하였다. p-IκB/IκB 단백질 발현을 측정한 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FFAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 단백질 발현은 C군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 3B, *p* < 0.05). p-p65/p-65 단백질 발현을 측정한 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FFAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 감소하였다. FFAE 100에서는 C군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 FFAE 200, FFAE 400에서는 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다(Fig. 3C, *p* < 0.05). iNOS와 COX-

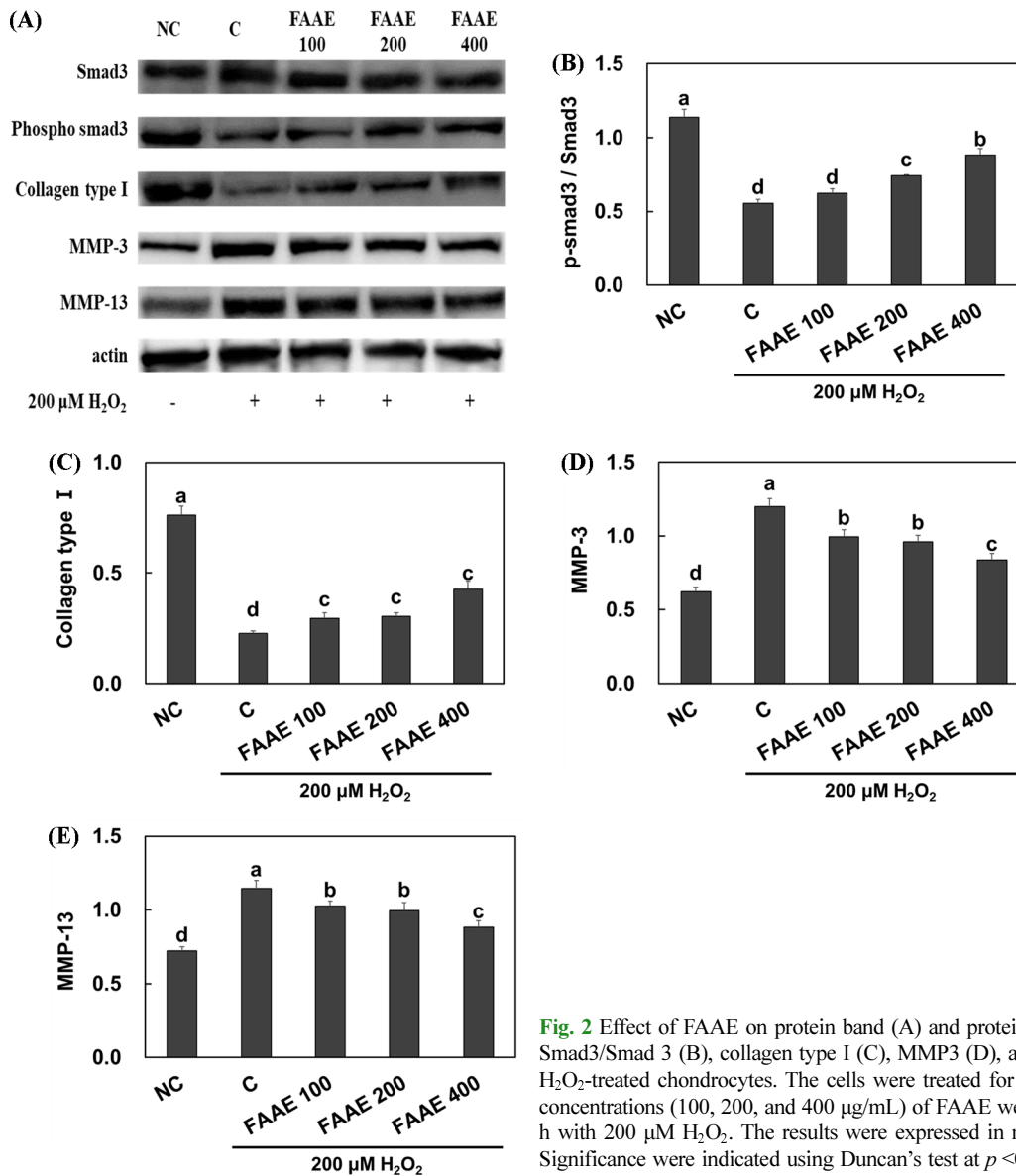


Fig. 2 Effect of FAAE on protein band (A) and protein expression of p-Smad3/Smad 3 (B), collagen type I (C), MMP3 (D), and MMP13 (E) in H₂O₂-treated chondrocytes. The cells were treated for 24 h with various concentrations (100, 200, and 400 μg/mL) of FAAE were incubated for 2 h with 200 μM H₂O₂. The results were expressed in mean ± SD values. Significance were indicated using Duncan’s test at *p* < 0.05

2 단백질 발현을 측정된 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 단백질 발현은 C군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 3D, 3E, *p* < 0.05). 이상의 실험 결과에 따라 LPS 처리로 인해 발생한 염증 관련 단백질 발현이 FAAE에 의해 감소함으로써 연골 세포 보호 효과가 있을 것으로 생각된다.

LPS에 의한 세포사멸 관련 인자 단백질 발현 변화

Apoptosis가 일어나는 과정에서 Bcl-2 family와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway가 중요하게 작용한다. Bcl-2 family는 anti-apoptotic 및 pro-apoptotic intrinsic pathway를 조절하는 단백질로 미토콘드리아 막투과를 매개하여 apoptosis가 일어나게 되고, MAPK signal pathway는 extracellular signal-regulated kinase, Jun Kinase (JNK/SAPK), p38 등 3가

지가 매우 특징적인데, 주로 염증성 사이토카인에 의해 JNK, p38 등이 활성화가 나타나 apoptosis가 일어나게 된다. MAPK signal pathway에서 가장 많은 영향을 받는 인자는 AP-1으로 Jun과 Fos family 단백질로 구성되어있다. c-Jun과 c-Fos의 heterodimer 형태로 존재할 때 가장 높은 전사활성을 가지는데, 외부 환경의 자극, 사이토카인, 성장인자 등에 의해 c-Jun과 c-Fos의 단백질 발현이 증가하고 c-Jun은 JNK와 p38에 의해 인산화되어 활성화된다. 또다른 apoptosis의 기전으로는 Fas ligand 나 TNF-α가 세포막의 수용체와 결합하여 신호를 전달하면 세포 내 caspase 9 또는 caspase 8이 활성화되어 procaspase3를 caspase 3로 활성화시켜 apoptosis가 일어나게 된다[26,27].

SD rat에서 primary한 chondrocyte에 FAAE와 LPS를 처리한 후 세포사멸 관련 단백질 발현 변화를 측정하였다. p-JNK/JNK 단백질 발현을 측정된 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를

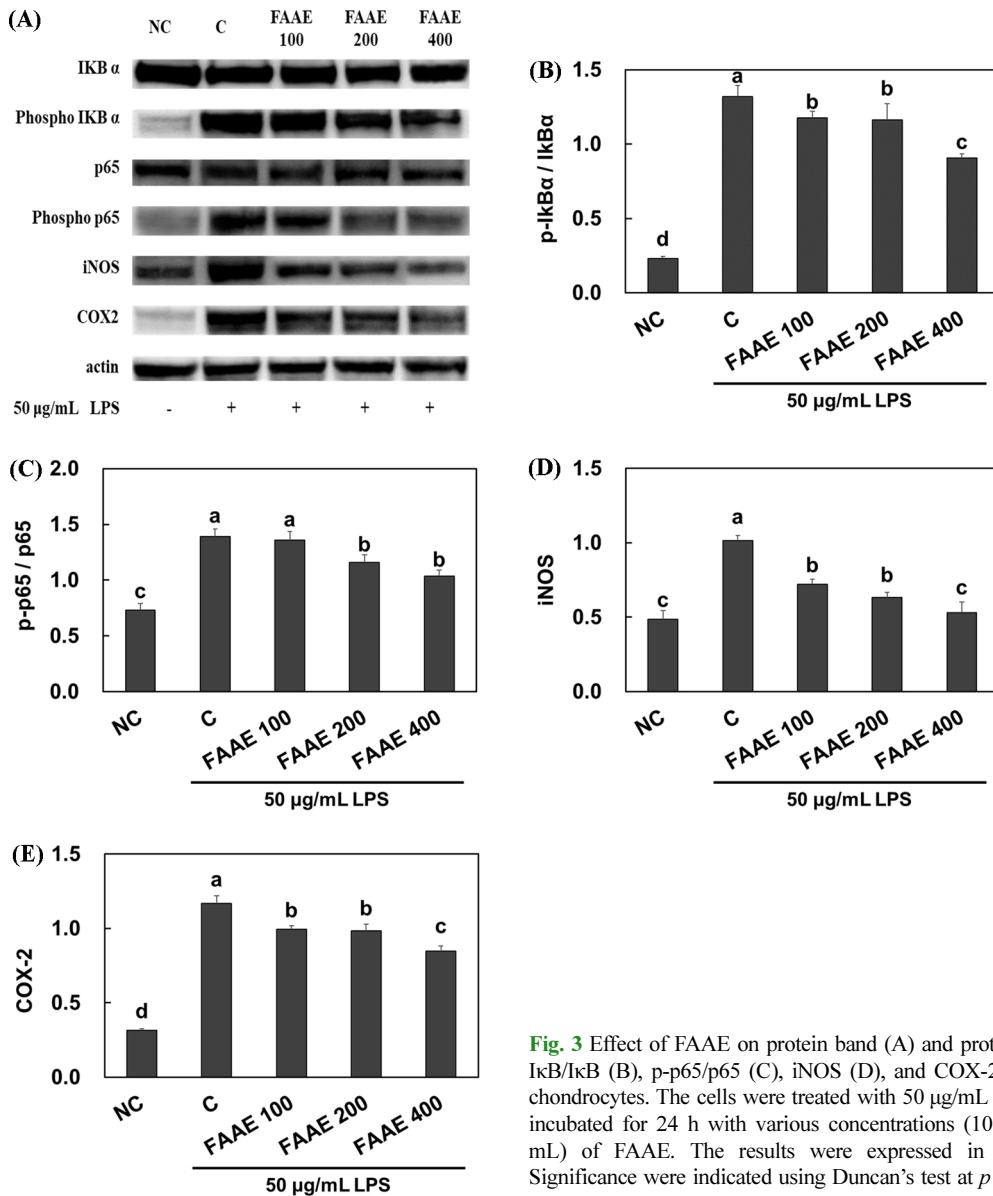


Fig. 3 Effect of FAAE on protein band (A) and protein expression of p-IκB/IκB (B), p-p65/p65 (C), iNOS (D), and COX-2 (E) in LPS-treated chondrocytes. The cells were treated with 50 μg/mL LPS except NC and incubated for 24 h with various concentrations (100, 200, and 400 μg/mL) of FAAE. The results were expressed in mean ± SD values. Significance were indicated using Duncan’s test at $p < 0.05$

각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 단백질 발현은 C군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 4A, $p < 0.05$). p-c-Fos/c-Fos 단백질 발현을 측정된 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 유전자 발현은 C군에 비해 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 4B, $p < 0.05$). p-c-Jun/c-Jun 단백질 발현을 측정된 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 단백질 발현은 C군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 4C, $p < 0.05$). Cleaved caspase 3/caspase3 단백질과 Bax/Bcl-2 단백질 발현을 측정된 결과, LPS만을 처리한 C군에서 LPS를 처리하지 않은 NC군에 비해 유의적으로 증가하였고, FAAE를 각 농도별로 처리한 후 LPS를 처리한 군들의 단백질 발현은 C군에 비해 농

도의존적으로 감소하였다(Fig. 4D, 4E, $p < 0.05$). 이상의 실험 결과에 따라 LPS 처리로 인해 발생한 세포사멸 관련 단백질 발현이 FAAE에 의해 감소함으로써 연골 세포 보호 효과가 있을 것으로 생각된다.

퇴행성 관절염은 연골조직이 점차적으로 손상되어 염증과 통증을 수반하는 60세 이상 노인의 1/3에서 발생하는 흔한 만성 퇴행성 질환이다. 퇴행성 관절염의 치료법으로는 비스테로이드계 항염제, 마약성 진통제 등 경구용 약제, 스테로이드제, 히알루론산 등 관절강 내 주사제, 또는 수술요법 등 다양하지만 장기복용 부담 및 부작용 등의 문제가 나타나면서 관절염에 대한 건강기능식품의 수요가 급격히 증가하고 있는 추세이다. 본 연구에서는 발효우슬, 당귀, 두충 추출 복합물(FAAE)을 이용하여 연골세포에서 세포사멸에 미치는 영향을 확인하고자 연구를 진행하였다. Primary 한 연골세포에 FAAE를 처리한 후 Smad3,

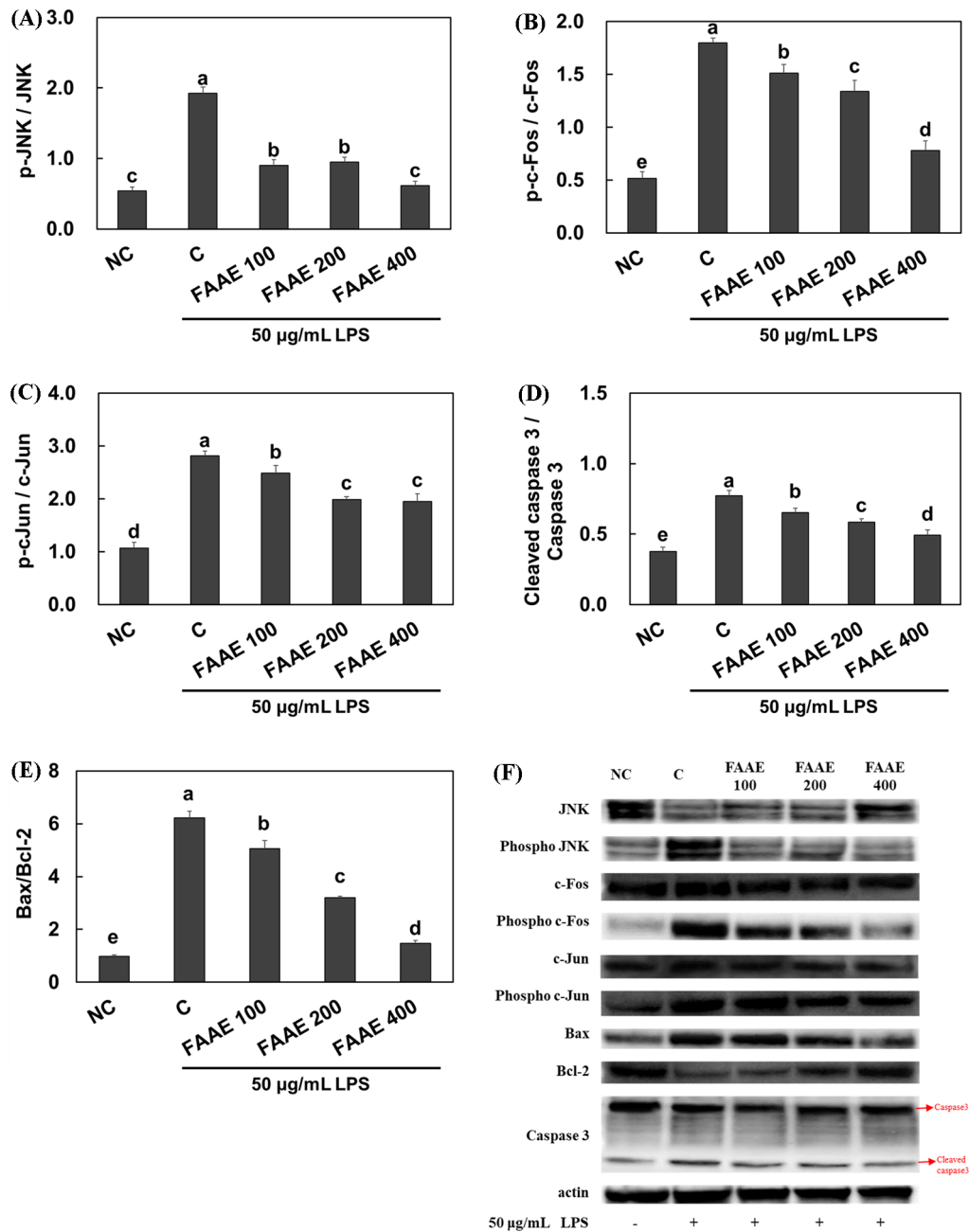


Fig. 4 Effect of FAAE on protein expression of p-JNK/JNK (A), p-c-Fos/c-Fos (B), p-c-Jun/c-Jun (C), cleaved caspase 3/caspase 3 (D), and Bax/Bcl-2 (E) and protein band (F) in H₂O₂-treated chondrocytes. The cells were treated for 24 h with various concentrations (100, 200, and 400 µg/mL) of FAAE were incubated for 2 h with 200 µM H₂O₂. The results were expressed in mean ± SD values. Significance were indicated using Duncan’s test at *p* < 0.05

collagen type 1과 같은 연골 생성 인자들의 발현을 증가시키고, MMPs와 같은 연골 분해 인자들의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 FAAE가 iNOS, COX-2, NF-κB 활성을 감소시켜 항염증에도 효과 있는 것으로 확인하였다. 그리고 LPS 처리로 증가된 JNK/c-Fos/c-Jun/Caspase 3의 활성 및 Bax/Bcl-2의 활성 또한 감소시켜 apoptosis 억제 효과에도 영향을 주는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 발효우슬, 당귀, 두충 추출 복합물이 연골 내 염증 및 apoptosis를 억제시켜 연골 건강에 도움을

줄 수 있는 건강기능식품의 소재로서 가치가 있으며, 본 연구가 연골 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품을 개발하기 위한 기초로 활용 가능할 것으로 보여 진다. 또한 본 연구는 세포 연구에 대한 결과이므로, 동물 실험을 통해 발효우슬, 당귀, 두충 추출 복합물이 소화흡수 된 후 연골 세포 내 염증 및 apoptosis에 미치는 영향에 대한 추후 연구가 필요하 것을 사료 된다.

초 록

SD rat에서 primary culture한 chondrocyte에서 발효우슬, 당귀, 두충 추출 복합물(FAAE)이 염증 및 세포사멸 조절에 미치는 영향을 알아보기 위하여, FAAE는 H₂O₂에 대한 세포 생존률, Smad3, Collagen type 1의 mRNA 및 단백질 발현을 증가시켰고, 염증 및 세포사멸 관련인자(NF-κB pathway, COX-2, iNOS, JNK, c-Fos, c-Jun, caspase 3, Bax, Bcl-2)의 단백질 발현을 감소시켰다. 본 연구는 FAAE가 염증 및 세포 사멸 억제제를 통해 연골세포 보호효과가 있음을 시사한다.

Keywords 당귀 · 두충 · 발효우슬 · 세포사멸 · 연골세포

References

- Malemud CJ (1993) Markers of osteoarthritis and cartilage research in animal models. *Curr Opin Rheumatol* 5(4): 494–502. doi: 10.1097/00002281-199305040-00015
- Falchuk KH, Goetzl EJ, Kulka JP (1970) Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 49(2): 223–231. doi: 10.1016/S0002-9343(70)80078-X
- Henrotin Y, Kurz B, Aigner T (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 13(8): 643–654. doi: 10.1016/j.joca.2005.04.002
- Molnar V, Matisić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, Rod E, Čukelj F, Vrdoljak T, Vidović D, Starešinić M, Sabalić S, Dobričić B, Petrović T, Antičević D, Borić I, Košir R, Zmrzljak UP, Primorac D (2021) Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis. *Int J Mol Sci* 22(17): 9208. doi: 10.3390/ijms22179208
- Hwang HS, Kim HA (2015) Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 16(11): 26035–26054. doi: 10.3390/ijms161125943
- Guo Q, Chen X, Chen J, Zheng G, Xie C, Wu H, Miao Z, Lin Y, Wang X, Gao W, Zheng X, Pan Z, Zhou Y, Wu Y, Zhang X (2021) STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF-κB signaling pathway. *Cell Death Dis* 12(1): 13. doi: 10.1038/s41419-020-03341-9.
- Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY, Henrotin Y (2003) Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Re* 52(3): 111–118
- Kwon PS (2016) Comparison of quantitative endotoxin against 5 species of Enterobacteriaceae. *Korean J Clin Lab Sci* 48: 124–129. doi: 10.15324/kjcls.2016.48.2.124
- Nam DE, Lee MJ, Kang N, Park G, Lee J (2012) A comparative study of rose hip extracts on osteoarthritis in cartilage cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(12): 1663–1670. doi: 10.3746/jkfn.2012.41.12.1663
- Fries JF (1991) NSAID gastropathy: the second most deadly rheumatic disease? *Epidemiology and risk appraisal*. *J Rheumatol Suppl* 28: 6–10
- Jeong JW, Kim J, Choi EO, Kwon DH, Kong GM, Choi IW, Kim BH, Kim GY, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Choi YW, Hong SH, Park C, Choi YH (2017) *Schisandrae* Fructus ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *EXCLI J* 16: 265–277. doi: 10.17179/excli2017-119
- Han S-B, Lee CW, Yoon LD, Lee J-H, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Lee K, Park S-K, Kim HM (2005) Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from *Achyranthes bidentata* and *Atractylodes japonica*. *Arch Pharm Res* 28(8): 902–908. doi: 10.1007/BF02973875
- Xie F, Li X, Sun K, Y Chu, H Cao, N Chen, W Wang, M Liu, W Liu, D Mao (2001) An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage. *J Tradit Chin Med* 21(3): 225–231
- Chen XM, Tian GY (2003) Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydr Res* 3338(11): 1235–1241. doi: 10.1016/S0008-6215(03)00073-9
- Kwon JH, Han MS, Lee BM, Lee YM (2015) Inhibitory effect of *Angelica gigas* extract powder on induced inflammatory cytokines in rats osteoarthritis. *J Anal Sci Technol* 28(4): 260–269. doi: 10.5806/AST.2015.28.4.260
- Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim B-S (2015) Quantitative determination of the six marker compounds in *Eucommiae* Cortex by processing method. *Korean J Physiol Pharmacol* 46(2): 123–132
- Lu H, Jiang J, Xie G, Liu W, Yan G (2013) Effects of an aqueous extract of *Eucommia* on articular cartilage in a rat model of osteoarthritis of the knee. *Exp Ther Med* 6(3): 684–688. doi: 10.3892/etm.2013.1223
- Kim D, Lee D, Oh D, Jeong HC, Lee SJ, Sohn J, Kim OK, Lee J (2020) A mixture containing fermented *Achyranthes japonica* nakai ameliorates osteoarthritis in knee joints of monoiodoacetate-injected rats. *J Med Foods* 23(8): 811–817. doi: 10.1089/jmf.2019.4552
- Choi DH, Lee SJ, Jeong HC, Kim KM, Kwon MY, Lee S, Sohn J (2019) Anti-osteoarthritis and anti-arthrodynia effects of a mixture of fermented *Achyranthes japonica* Nakai, *Angelica gigas* Nakai, and *Eucommia ulmoides* Oliver Extracts on monosodium iodoacetate-Induced arthritis in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48(11): 1179–1185
- Jeong CH, Lee SJ, Choi DH, Kwon MY, Sohn J, Lee SH (2019) A novel strain of *Lactobacillus plantarum* SKB1234 having an improving effect on arthritis and a method for producing a mixture of the fermented *Achyranthes japonica* Nakai extract using the *Lactobacillus plantarum* SKB1234, *Angelica gigas* Nakai extract and *Eucommia ulmoides* Oliver extract. Korea Patent 10-2019-0049002
- Kim D, Lee D, Yun JM, Jeong HC, Lee SJ, Sohn J, Lee J (2020) Anti-inflammatory effect of fermented *Achyranthes japonica* Nakai, *Eucommia ulmoides* Oliver and *Angelica gigas* Nakai extracts on primary chondrocyte cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49(6): 561–568. doi: 10.3746/jkfn.2020.49.6.561
- Kim OK, Kim D, Lee M, Park SH, Jung J, Lee J (2022) Krill oil attenuates inflammation in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats, SW982 synovial cell line, and primary chondrocytes. *J Med Food* 25(3): 239–250. doi: 10.1089/jmf.2021.K.0152
- Attisano L, Wrana JL (2000) Smads as transcriptional comodulators. *Curr Opin Cell Biol* 12: 235–243. doi: 10.1016/S0955-0674(99)00081-2
- Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E (2011) Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from oa patients. *Clin Exp Rheumatol* 29: 57–64
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1):16–34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976
- Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS (2022) ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem* 277(2): 1332–1339. doi: 10.1074/jbc.M107231200
- Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12(1): 9–18. doi: 10.1038/sj.cr.7290105