

## Regulatory mechanism of *Angelica Gigas* extract powder on matrix metalloproteinases *in vitro* and *in vivo* model

Jin-Hwan Kwon, Min-Seok Han, and Yong-Moon Lee<sup>1, \*</sup>

Natural Products Medical Research Institute, Nutragen Co., Anyang 13943, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

(Received October 21, 2015; Revised November 13, 2015; Accepted November 13, 2015)

## 참당귀 추출분말이 *in vitro* and *in vivo* model에서 MMPs 조절 기전

권진환 · 한민석 · 이용문<sup>1, \*</sup>

뉴트라젠 천연물화학연구소, <sup>1</sup>충북대학교 약학대학 생물분석화학교실

(2015. 10. 21. 접수, 2015. 11. 13. 수정, 2015. 11. 13. 승인)

**Abstract:** The precise mechanism underlying the therapeutic efficacy of an extraction powder of *Angelica gigas* (AGE) for the treatment of degenerative osteoarthritis was investigated in primary cultured rabbit chondrocytes and in a monosodium-iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. The treatment with AGE (50 µg/mL) effectively inhibited NF- $\kappa$ B activation. The anti-inflammatory mechanism was clarified by gelatin zymography and western blotting measurements of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activities. The AGE (50 µg/mL) treatment significantly reduced MMP-9 activity. The constituents of AGE—decursinol, decursin, and decursinol angelate—were determined by LC-MS/MS after a 24 hr treatment of rabbit chondrocytes. The contents of the major products, decursin and decursinol angelate, were  $3.62 \pm 0.47$  and  $2.14 \pm 0.36$  µg/mg protein, respectively in AGE-treated (50 µg/mL) rabbit chondrocytes. An *in vivo* animal study on rats fed a diet containing 25, 50, and 100 mg/kg AGE for 3 weeks revealed a significant inhibition of the MMPs in the MIA-induced rat articular cartilage. The genetic expression of arthritic factors in the articular cartilage was examined by RT-PCR of collagen Type I, collagen Type II, aggrecan, and MMP (MMP3, MMP-9, MMP13). Specifically, AGE up-regulated the expression of collagen Type I, collagen Type II, and aggrecan and inhibited MMP levels at all tested concentrations. Collectively, AGE showed a strong specific site of action on MMP regulation and protected against the degeneration of articular cartilage via cellular regulation of MMP expression both *in vitro* and *in vivo*.

**요 약:** 골관절염에 대한 참당귀 추출분말 (AGE)의 치료효과를 검토하고자 토끼연골세포와 흰쥐의 monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 골관절염 부위에서 시료를 채취하여 MMPs의 발현에 대한 AGE

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-261-2825 Fax : +82-(0)43-268-2732

E-mail : ymleefn@chungbuk.ac.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.

의 억제 효능을 검토하였다. 고 농도의 AGE (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 투여에서 세포독성은 관찰되지 않았으며 면역 및 염증반응과 관련된 여러 인자의 전사인자인 NF- $\kappa\text{B}$  활성화를 효과적으로 억제시켰다. 토끼연골 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 활성을 확인해본 결과 AGE는 MMP-9의 활성을 효과적으로 억제시키는 것을 확인하였다. AGE를 토끼연골세포에 처리하여 분석한 결과, 주요성분인 decursin과 decursinol angelate가  $3.62\pm 0.47 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 와  $2.14\pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 으로 검출되었다. 동물실험을 위하여, 골관절염은 MIA를 흰쥐 무릎관절에 처리하여 동물모델을 만들었으며, 매일 25, 50와 100 mg/kg의 AGE를 3주 동안 먹인 결과 흰쥐의 연골 조직에서 MMPs가 억제되는 것을 확인하였다. 연골조직으로부터 RT-PCR을 통해 collagen Type I, collagen Type II, aggrecan 및 MMPs (MMP-3, MMP-9, MMP-13)의 mRNA를 확인해본 결과 AGE는 collagen Type I, collagen Type II, aggrecan은 증가시키며 MMPs는 감소시키는 효과를 얻었다. 결론적으로 AGE는 MMPs 억제를 통하여 골관절염의 발생을 억제한다.

**Key words:** *Angelica gigas*, osteoarthritis, MMPs, Decursin, Decursinol angelate, extract

## 1. 서 론

골관절염은 가장 흔한 관절염으로 일반인에게서 60대나 70대가 되면 약 60% 이상에서 이환된다.<sup>1</sup> 골관절염은 일차성 골관절염과 이차성 골관절염으로 나눌 수 있는데 이차성 골관절염은 크게 관절 손상, 연골기질의 이상, 연골하골의 변형 등에 의해 유발되는 것으로 분류할 수 있다. 그러나 아직까지 일차성 골관절염의 정확한 원인 및 병인에 대해서는 알려져 있지 않다. 골관절염에서 초래되는 관절연골의 가장 기본적인 변화는 연골세포의 대사 이상으로 인해 연골기질의 생성과 분해 사이의 균형이 깨어져서 형성 장애를 초래하는 것이다.<sup>2</sup> 관절연골은 골 표면을 덮고 있으면서 관절이 움직일 때 골이 서로 맞닿아 생길 수 있는 마찰을 줄여 준다. 관절연골은 세포성분으로 연골세포가 있으나 극소수이고 거의 대부분(98-99%)은 연골기질로 이루어져 있다. 연골기질의 주성분은 제II형 교원질, 단백다당(proteoglycan), 물, 기타 단백질, 당단백 등으로 구성되어 있다.<sup>2</sup> 골관절염에서는 이러한 성분들이 여러 가지 원인에 의해 분해되는데, 그 중에는 matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) plasmin activator 및 plasmin activator inhibitor 계, cathepsin B 및 D 등 여러 가지 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>3-5</sup>

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 proteoglycan, collagen, gelatin 및 aggrecan 등 연골을 구성하는 기질단백질분해효소로서, interleukin-1 (IL-1)와 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 같은 염증성 사이토카인에 의해 유도된다. MMP에는 여러 종류가 있으나 이 중 주된 작용을 하는 것이 MMP-1 (collagenase)과 MMP-3

(stromelysin)이며 MMP에 억제 작용을 하는 것이 TIMP이다. MMP와 그 억제제인 TIMP는 교원질 및 단백다당과 같은 세포외기질 성분을 분해시키는 아연 의존성 효소로서 골관절염의 병인에 중요한 역할을 한다.<sup>2</sup> 최근의 연구 보고에 따르면 관절염의 연골 추출물을 이용한 실험에서 정상에 비해 관절염의 경우 MMP 농도 및 TIMP 농도가 모두 증가하였으나, TIMP의 농도에 비해 MMP의 농도가 훨씬 높게 증가하여 상대적 MMP의 과다생성이 골관절염에서의 연골분해와 관련이 있다고 한다.<sup>6-8</sup>

골관절염은 퇴행성 만성질환으로 근본적인 치료법은 없으며, 주로 통증 완화와 연골손상 방지에 초점을 맞춰 치료가 진행되고 있다. 골관절염 치료제로는 비스테로이드성 소염진통제(NSAID), 진통제, 코르티코스테로이드, 관절강 내 하이알루론산 주사 등이 사용되고 있으나, 이들 치료제는 위장관 장애나 심혈관계 부작용 등을 유발한다고 보고됨에 따라 장기간 복용에 어려움이 있으며, 따라서 최근에는 천연물 기반의 건강기능식품에 대한 관심과 수요가 급격히 증가하고 있다.<sup>9</sup>

당귀는 미나리과에 속하는 다년생 초본식물로서, 1~2년 된 생근을 가을에 채취하여 건조시켜 생약재로 사용하고 있다. 당귀는 한국, 일본, 중국 등 주로 동남아시아에서 약용을 목적으로 재배되고 있으며, 그 산지에 따라 한국에서 생산되는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 일본에서 생산되는 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw), 그리고 중국에서 생산되는 중국당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 구분된다. 예로부터 당귀는 대표적인 보혈제로서, 피를 보하고 피의 흐름을 좋게 하여 빈혈이나 어혈로 인한 혈행장애 개선에 널리 사용되고 있

으며, 생리불순, 허약체질, 두통 및 복통 치료에도 널리 이용되고 있다. 당귀의 주요성분으로서는 pyranocoumarin계 화합물인 decursin, decursinol nodakentin 및 nodakenin과 휘발성 성분인  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -pinene, 등이 알려져 있다. 당귀의 약리작용으로는 항산화, 항암, 항염증 및 혈액순환 개선 등 다양한 효능이 보고된 바 있다.<sup>10-11</sup>

본 연구에서는 IL-1 $\alpha$ 로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포와 monosodium iodoacetate (MIA)로 골관절염이 유도된 흰쥐를 이용하여 참당귀 추출분말(AGE)이 관절연골에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

시험물질로 사용된 AGE는 뉴트라젠으로부터 공급받았다. 골관절염 유발에 사용된 monosodium iodoacetate는 Sigma Chemical Co.(USA)에서, 동물마취제인 Zoletil과 Rompun은 바이엘코리아(대한민국)에서 구입하였다.

### 2.2. 실험동물

6 주령의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(오리엔트바이오, 한국) 60 마리를 구입하여 충북대학교 동물사육실 내에서 온도 23 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C, 습도 55 $\pm$ 5%, 12 시간 주기의 명암 조건에서 1 주간 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료는 실험동물용 사료(삼양유지사료(주), 한국)와 멸균된 음용수를 자유로이 공급하였다.

### 2.3. 실험군의 분류 및 골관절염 유발

사육실에서 1 주간 적응을 거친 실험동물의 체중을 측정하여 각 군당 12 마리씩 5 개군(정상군, 대조군, 처리군 1, 처리군 2 및 처리군 3)으로 고르게 배정하였다. 골관절염 유발을 위하여 Zoletil과 Rompun이 2:1 비율로 희석된 마취제를 흰쥐에 투여하여 마취시킨 후, 양쪽 무릎주변을 깨끗이 제모하고 1 mL 주사기를 이용하여 양쪽 슬관절강 내에 생리식염수로 희석된 MIA (monosodium iodoacetate, 30 mg/mL) 용액 0.1 mL을 주사하였다. 정상군 (N)은 양쪽 슬관절강 내에 각각 주사용 생리식염수 0.1 mL을 주사하고, 증류수 1 mL을 3 주간 매일 1 회씩 경구 투여하였다. 대조군 (C)은 양쪽 슬관절강 내에 MIA 용액 0.1 mL을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 증류수 1 mL

을 3 주간 매일 1 회씩 경구 투여하였다. 처리군 (25, 50 및 100)은 양쪽 슬관절강 내에 MIA 용액 0.1 mL을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 AGE를 각각 25, 50 및 100 mg/kg 농도로 희석한 시험물질 1 mL을 3 주간 매일 1 회씩 경구 투여하였다.

### 2.4. 세포배양

본 연구에 사용된 토끼 연골조직세포 (chondrocyte)는 2~3 주령 New Zealand white 토끼 관절로부터 연골조직을 분리하여 1 차 배양한 후, 사용하였다. 토끼 연골조직세포는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) 배지를 사용하여 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 2.5. 세포독성 측정

AGE의 세포독성 유무를 알아보기 위하여 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan)를 이용하여 WST assay를 실시하였다. 토끼 연골조직세포를 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 접종하고 12 시간 배양한 다음, AGE를 농도별 (0, 5, 10, 25 및 50  $\mu$ g/mL)로 처리하여 24 시간 배양하였다. 각 well 당 10  $\mu$ L의 WST-8 용액을 첨가하여 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3 시간 반응시킨 후, ELISA reader (BIO-TEK Instruments Inc., Power wave X340, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험값은 AGE를 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

### 2.6. Western blotting

염증이 유발된 토끼 연골조직세포에서 AGE가 NF- $\kappa$ B 활성화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 토끼 연골조직세포를 6 well plate에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well로 접종하고 24 시간 배양한 다음, IL-1 $\alpha$  (5 ng/mL)를 단독 또는 다양한 농도의 AGE (0, 10, 25 및 50  $\mu$ g/mL)과 함께 처리하여 1 시간 배양하였다. 배양액을 버리고 세포를 수집하여 PBS (Gibco)로 2회 세척한 후, hypotonic buffer (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP-40)를 넣고 얼음에서 10 분간 반응시켰다. 부유물을 4  $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 따로 수집한 후, cytosolic fraction으로 사용하였다. Nuclear fraction을 얻기 위하여 세포핵을 포함한 펠렛에 nuclear extraction buffer (20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M

NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM OMSF, 0.5 mM DTT)를 첨가하여 30분간 얼음에 방치한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하였다. BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 후, 20 µg씩 동일한 양의 각 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 전기영동하고, nitrocellulose membrane(Whatman, Dassel, Germany) 상으로 이동시켰다. 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 membrane에 5% 탈지분유를 넣고 1시간 반응시킨 다음, p65 (Cell Signaling, USA), I-kBα (Cell Signaling) 및 β-actin (Sigma) 항체가 첨가된 5% 탈지분유로 교체하여 4 °C에서 12 시간 반응시켰다. TBST (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 5 분간 3 회 세척하고 각각에 대한 이차항체로 실온에서 1 시간 반응시킨 후, ECL 용액 (Amersham Pharmacia Biotech., NJ, USA)을 이용하여 각 단백질의 발현을 확인하였다.

### 2.7. Gelatin zymography

AGE가 MMP-2 및 MMP-9 활성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다. 토끼 연골조직세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 접종하고 24 시간 배양한 다음, IL-1α (5 ng/mL)를 단독 또는 다양한 농도의 AGE (0, 10, 25 및 50 µg/mL)과 함께 처리하여 24 시간 배양하였다. 각각의 배양액을 수집하여 원심분리시켜 상등액을 취한 다음, loading buffer에 섞어 동일한 양씩 10% zymogram gel에 전기영동하였다. Gel을 2.5% Triton X-100 용액에 넣고 실온에서 30분간 2 회 세척하여 gel 상에 남아 있는 SDS를 제거하였다. developing buffer (0.05 M Tri-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 1 M ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)를 첨가하여 37 °C에서 48시간 반응시켰다. 반응이 끝난 gel에 0.25% Coomassie brilliant blue (R250, Sigma) 용액을 넣고 1 시간 염색한 후, 탈색 용액 (30% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색하였다.

### 2.8. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

AGE 가 COL-1 (collagen type I), COL-2 (collagen type II), aggrecan, MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. AGE를 3 주간 투여된 골관절염 유발 흰 쥐에서 연골을 적출하여 분쇄한 후, total RNA

**Table 1.** RT-PCR primers used in study

Gene	Primer sequence
Collagen type I	Forward GAGCGGAGAGTACTGGATCGA
	Reverse CTGACCTGTCTCCATGTTGCA
Collagen type II	Forward GCAACAGCAGGTTACAGTACA
	Reverse TCGGTACTCGATGATGGTCTTG
Aggrecan	Forward GAAGTGGCGTCCAAACCAA
	Reverse CGTTCCATTCACCCCTCTCA
MMP-3	Forward GAGTGTGGATTCTGCCATTGAG
	Reverse TTATGTCAGCCTCTCCTTCAGAGA
MMP-9	Forward GCGCCAGCCGACTTATGT
	Reverse AATCCTCTGCCAGCTGTGTGT
MMP-13	Forward ACGTTC AAGGAATCCAGTCTCTCT
	Reverse GGATAGGGCTGGGTACACTT
GAPDH	Forward TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC
	Reverse CAGCAACTGAGGGCCTCTCT

extraction kit (iNtRON Biotechnology Inc., Korea)를 이용하여 연골조직으로부터 total RNA를 분리하였다. Total RNA를 정량하고, RT-PreMix (iNtRON Biotechnology Inc.)를 이용하여 1 µg씩 동일한 양의 각 total RNA로부터 각각의 cDNA를 합성하였다. COL-1, COL-2, aggrecan, MMP-3, MMP-9, MMP-13 및 GAPDH 등 각각의 유전자에 해당되는 프라이머를 사용하여 94 °C 1분, 50~65 °C 45초, 72 °C 1분, 총 30 cycles 조건으로 RT-PCR을 수행하였다(Table 1).

### 2.9. AGE의 성분분석

세포 내의 decursin과 decursinol angelate의 분석을 위한 LC-MS/MS는 기기는 API 3000 ESI-MS/MS (ABSCIEX, Toronto, Canada)를 사용하였으며, HPLC는 Agilent 1100 series (Agilent, USA)를 연결하여 system을 사용하였으며 소프트웨어는 Analyst 1.4.2 (ABSCIEX, Toronto, Canada)를 사용하여 분석하였다. 분석에 이용된 컬럼은 KINETEX (2.0 × 100 mm, 2.6 µm, Phenomenex, USA)를 사용하였다.

이동상 조건은 0.1% 개미산 수용액 (A)과 0.1% 개미산을 함유한 아세트니트릴 용액(B)로 구성되어 gradient 분리 방법을 사용하였다. 용매 비율은 0-4 min (30→30, B), 4-33 min (30→70, B), 33-34 min (70→70, B), 34-35 min (70→30, B), 35-40 min (30→30, B)로 설정되었으며, 유속은 0.3 mL/min으로 하였고, 주입량은 5 µL였다.

LC/MS/MS 분석 조건으로 MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode에서 monitor되었으며, ESI (electrospray ionization source)interface가 사용되었다. Decursin과

decursinol angelate 분석은 positive ion mode에서 시행하였으며 decursin과 decursinol angelate의 이온화 monitoring은 m/z 329>211로 decursinol m/z 247>229 분석하였다.

Desolvation gas로 질소를 사용하였으며, decursin과 decursinol angelate 분석을 위한 collision energy는 동일하게 23 eV이었으며 decursinol은 17eV였으며, ESI source temperature는 400 °C로 설정하였다.

AGE의 세포내의 농도변화를 관찰하기 위하여 0, 5, 10, 25 그리고 50 µg/mL로 처리하여 추출 후, decursin 및 decursinol angelate (m/z 329→211) 및 decursinol (m/z 247→229)을 LC-MS/MS로 모니터링 하였다.

### 2.10. 통계처리

본 연구에서 얻은 정량적인 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 이용하여 통계처리하였으며, 유의성은 \*p<0.05 수준에서 검정하였고 그 값은 평균 (mean)±표준편차(Standard deviation)로 표기하였다.

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1. 세포독성능 평가

토끼 연골조직세포에 AGE를 농도별 (0, 5, 10, 25 및 50 µg/mL)로 처리하여 24 시간 배양한 후, 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 실험에 사용된 모든 농도에서 100% 이상의 세포생존율을 보임에 따라 AGE 처리에 따른 세포독성은 없는 것으로 판단하였다.

### 3.2. 토끼 연골조직세포에서 NF-κB 활성화 억제 효과

NF-κB는 면역 및 염증반응과 관련된 여러 인자들

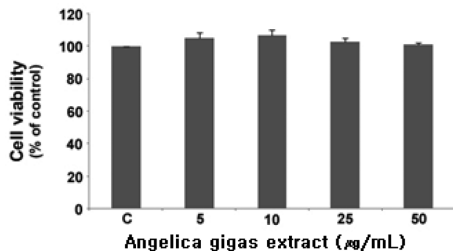


Fig. 1. Effect of *Angelica gigas* extract powder on the viability of rabbit chondrocytes. Rabbit chondrocytes were incubated with the indicated concentrations of *Angelica gigas* extract powder for 24 hr. Cell viability was determined by the WST assay.

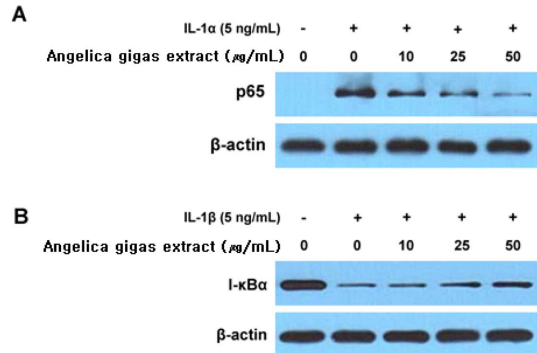


Fig. 2. Effect of *Angelica gigas* extract powder on NF-κB activation in rabbit chondrocytes stimulated IL-1α. Rabbit chondrocytes were incubated with indicated concentrations of *Angelica gigas* extract powder and 5 ng/mL IL-1α for 1 hr. (A) Nuclear extract was isolated and subjected to Western blotting detecting p65 protein. (B) The cytosolic protein levels of I-κBα was determined by Western blotting analysis. Equal loading of proteins was verified by β-actin blotting.

의 전사인자(transcription factor)로서, AGE가 NF-κB 활성화 억제에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.<sup>12</sup> 이를 위해 IL-1α로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포에 AGE를 농도별 (0, 10, 25 및 50 µg/mL)로 처리하여 1 시간 배양한 후, NF-κB subunits인 p65와 I-κBα 단백질 발현을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이, 토끼 연골조직세포에서 IL-1α 처리 시 p65 단백질의 핵 내 이동이 증가된 반면 세포질 내 I-κBα 단백질은 크게 감소되었다. 하지만 AGE를 처리할 시 p65 단백질의 핵으로의 이동은 억제되었으며, 세포질 내 I-κBα 단백질 양이 다시 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.3. 토끼 연골조직세포에서 MMP-2 및 MMP-9 활성화 억제 효과

연골세포는 sulfated proteoglycan과 collagen type 2 등 연골 특이적인 extracellular matrix (ECM) 단백질을 정상적으로 합성한다. 하지만 골관절염 진행상태의 연골조직에서는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 및 MMP-13 등 특정 MMPs 발현 및 활성이 증가되어 관절조직의 파괴를 가속화시킨다. 따라서 본 실험에서는 IL-1α로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포에서 AGE가 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 이를 위해 IL-1α로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포에 AGE를 농도별 (0, 10,

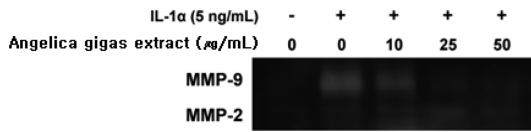


Fig. 3. Effect of Angelica gigas extract powder on enzyme activities of MMP-2 and MMP-9. After treatment with IL-1 $\alpha$  and Angelica gigas extract powder, the culture media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue. The experiment was repeat in twice independent.

25 및 50  $\mu$ g/mL)로 처리하여 24 시간 배양한 후, MMP-2 및 MMP-9 활성을 측정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, 토끼 연골조직세포에서 IL-1 $\alpha$  처리 시 MMP-9 활성이 크게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 AGE를 처리할 시 MMP-9 활성은 점차 감소되었으며, 최고처리농도인 50  $\mu$ g/mL에서는 거의 정상 수준까지 감소되었으나, MMP-2 활성에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

#### 3.4. 골관절염 유발 흰쥐에서 COL-1, COL-2 및 aggrecan 유전자 발현 측정

연골 조직은 동화작용 (anabolism)과 이화작용 (catabolism)의 균형에 의해 유지된다. 동화작용은 collagens, tissue inhibitors of metalloprotenases (TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 관여하는 반면 이화작용은 MMPs, NO, TNF- $\alpha$ , collagenase, aggrecanase 등이 관여한다. 동화작용에 관여하는 인자 중 collagen type 1은 연골세포뿐만 아니라 인체에 가장 많이 분포하는 단백질이며, collagen type 2는 연골조직 단백질의 50%를 차지하면서 연골조직에 분포하는 collagen 중 약 85~90%를 차지하고 있는 주요 단백질이다. 또한 aggrecan은 연골조직에서 주로 발견되는 proteoglycan이다. 따라서 본 실험에서는 MIA로 관절염이 유발된 흰쥐에서 AGE가 연골조직 내 collagen type 1, collagen type 2 및 aggrecan 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이, 골관절염이 유발된 대조군은 그렇지 않은 정상군에 비해 collagen type 1, collagen type 2 및 aggrecan 유전자 발현이 크게 감소되었다. 하지만, AGE 100 mg/kg 투여군은 골관절염 유발군인 대조군에 비해 collagen type 1 유전자 발현이 유의적으로 증가되었으며, collagen type 2 유전자 발현 또한 100 mg/kg 투여군에서 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 게다가 Aggrecan 유전자 발현은 모든 AGE 투여

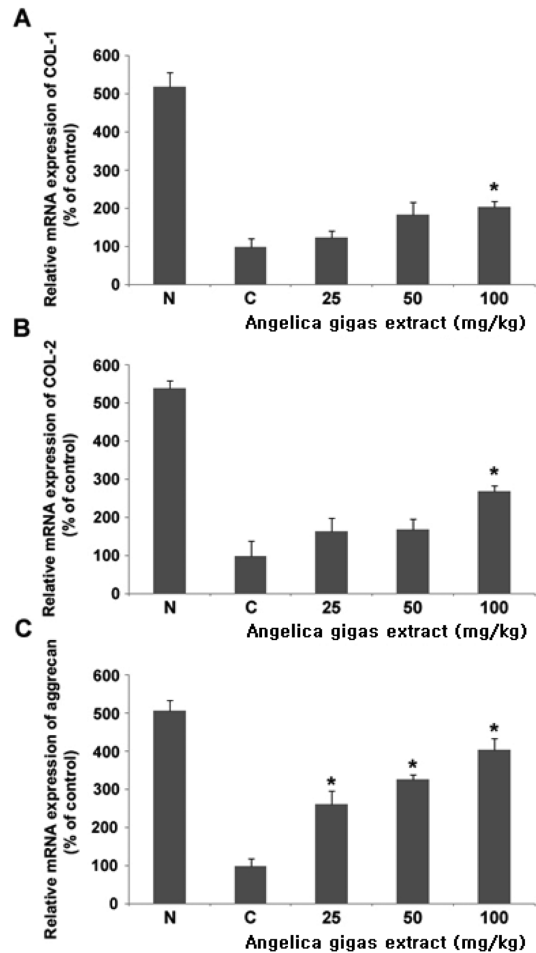


Fig. 4. Effect of Angelica gigas extract powder on the mRNA expressions of COL-1, COL-2, and aggrecan in cartilage from knee joints of rats at 3 weeks after MIA injection. The mRNA expressions of COL-1 (A), COL-2 (B), and aggrecan (C) in cartilage from knee joints of rats at 3 weeks after MIA injection was determined by RT-PCR. Data are shown as Mean $\pm$ S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (100 mg/kg).

군에서 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 AGE가 연골조직의 동화작용에 관여하는 collagen type 1, collagen type 2 및 aggrecan 발현 증가에 효과적임을 알 수 있었다.

### 3.5. 골관절염 유발 흰쥐에서 MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현 측정

MMPs는 연골 조직의 이화작용에 관여하는 주요 단백질로서, 그 중에서도 특히 MMP-3, MMP-9 및

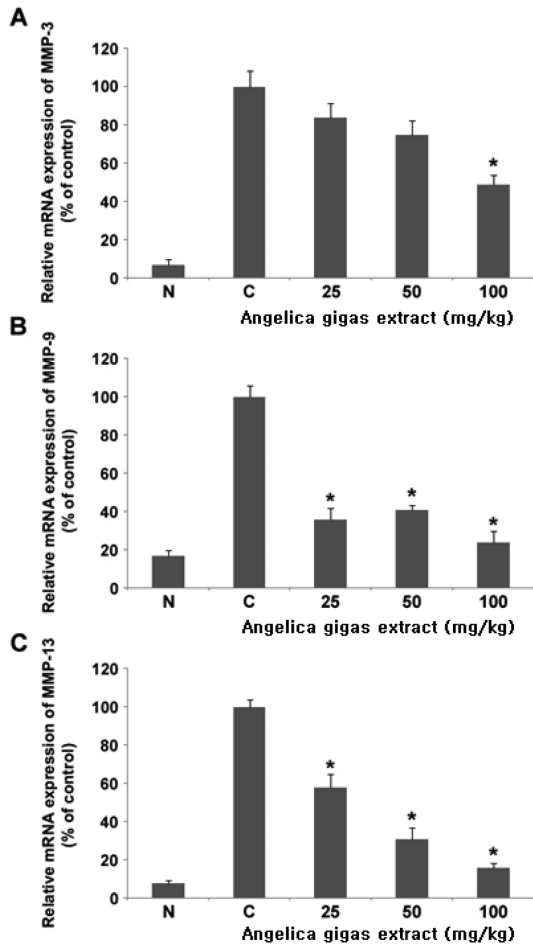


Fig. 5. Effect of *Angelica gigas* extract powder on the mRNA expressions of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in cartilage from knee joints of rats at 3 weeks after MIA injection. The mRNA expressions of MMP-3 (A), MMP-9 (B), and MMP-13 (C) in cartilage from knee joints of rats at 3 weeks after MIA injection was determined by RT-PCR. Data are shown as Mean $\pm$ S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with *Angelica gigas* extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with *Angelica gigas* extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with *Angelica gigas* extract powder (100 mg/kg).

MMP-13은 퇴행성 골관절염에서 발현 및 활성이 크게 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 MIA로 관절염이 유발된 흰쥐에서 AGE가 MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현 억제에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, 골관절염이 유발된 대조군은 그렇지 않은 정상군에 비해 MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현이 크게 증가되었다. 하지만 AGE 100 mg/kg 투여 시 MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현이 모두 유의적으로 억제되었으며, MMP-9과 MMP-13 유전자 발현은 AGE 저농도 (25 mg/kg) 투여시에도 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 AGE가 연골조직의 동화작용 인자뿐만 아니라 이화작용 인자에도 효과적으로 작용하여 연골조직을 보호하는 것을 알 수 있었다.

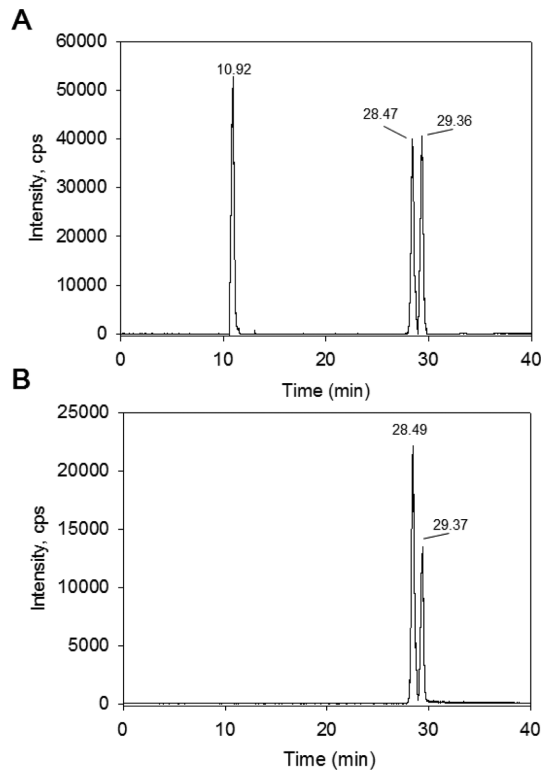


Fig. 6. Representative LC-MS/MS chromatogram of the standard (decursinol, decursin and decursinol angelate) (A) and *Angelica gigas* powder treated Rabbit chondrocytes (B). Rabbit chondrocytes were extracted with acetonitrile and analyzed with a KINETEX C18 column and gradient eluted with 0.1% formic acid containing water and 0.1% formic acid containing acetonitrile.

Table 2. Quantification of decursine and decursinol angelate in *Angelica gigas* powder treated rabbit chondrocytes

Angelica gigas powder treatment concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Decursine ( $\mu\text{g/mg protein}$ )	Decursinol angelate ( $\mu\text{g/mg protein}$ )
5	0.47 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.03
10	0.81 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.07
25	1.94 $\pm$ 0.11	1.09 $\pm$ 0.17
50	3.62 $\pm$ 0.47	2.14 $\pm$ 0.36

### 3.6. 참당귀 성분의 토끼 연골조직세포에서 분석

IL-1 $\alpha$ 로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포에 AGE를 농도별 (0, 5, 10, 25 및 50  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하여 24 시간 배양한 후, decursinol, decursin 및 decursinol angelate를 LC-MS/MS로 분석을 시행하였다. decursinol은 검출이 되지 않았으며, decursin과 decursinol angelate는 각각 28.5와 29.4분에서 용출되었다(Fig. 6). IL-1 $\alpha$ 로 염증이 유도된 토끼 연골조직세포내에 잔존하는 decursin과 decursinol angelate는 5, 10, 25 및 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 AGE를 처리 시 decursin의 경우 0.47 $\pm$ 0.05, 0.81 $\pm$ 0.06, 1.94 $\pm$ 0.11 및 3.62 $\pm$ 0.47  $\mu\text{g/mg protein}$ 으로 검출 되었으며 decursinol angelate는 0.23 $\pm$ 0.03, 0.47 $\pm$ 0.07, 1.09 $\pm$ 0.17 및 2.14 $\pm$ 0.36  $\mu\text{g/mg protein}$ 으로 검출됨을 확인하였다(Table 2).

## 4. 결 론

본 연구에서는 토끼 연골로부터 primary culture된 연골조직세포와 MIA로 골관절염이 유발된 흰쥐 실험 모델을 이용하여 당귀 추출분말의 연골보호 효과를 확인하였다. 본격적인 실험에 앞서 AGE의 세포독성 유무를 확인하기 위하여 AGE를 다양한 농도 (0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 후, 세포생존률을 측정하였으며, AGE를 처리한 후, MMP-2 및 MMP-9 활성을 측정하였다. 또한 AGE의 골관절염 억제 작용기전을 알아보기 위하여 토끼 연골조직세포에서 염증반응 매개하는 것으로 알려진 NF- $\kappa$ B 활성화 억제기전을 확인하였다. 마지막으로 MIA로 골관절염이 유발된 흰쥐에 AGE를 3주간 경구투여한 후, 흰쥐 무릎관절 연골조직 내 COL-1, COL-2, aggrecan, MMP-3, MMP-9 및 MMP-13 유전자 발현량을 측정하였다.

그 결과, 실험에 사용된 모든 농도의 AGE에서 토끼 연골조직세포 독성은 관찰되지 않았으며, MMP-9

활성은 AGE의 농도에 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. AGE는 NF- $\kappa$ B 활성화 또한 억제하였다. AGE는 MIA로 골관절염이 유발된 흰쥐 무릎관절 연골조직 내 COL-1, COL-2, aggrecan 유전자 발현은 증가시키는 반면 MMP-3, MMP-9, MMP-13 유전자 발현은 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 AGE를 세포에 투여시 주성분인 decursin 및 decursinol angelate는 농도 의존적으로 세포내에 흡수가 잘되는 것으로 확인된다.

상기의 결과를 근거로 AGE는 토끼 연골조직세포는 물론 MIA로 골관절염이 유발된 흰쥐의 무릎관절 연골조직에서 연골조직의 동화인자 (COL-1, COL-2 및 aggrecan)의 생성은 촉진시키는 한편, 이화인자 (MMP-3, MMP-9 및 MMP-13)의 활성 및 생성을 억제하여 골관절염 진행 억제효과를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 충북대학교 학술연구비에 의하여 수행된 연구결과입니다.

## References

1. D. Felson, *Epidemiol Rev.*, **10**, 1-28 (1988).
2. V. B. Kraus, *Med. Clinics North Am.*, **81**, 85-112 (1997).
3. J. Martel-Pelletier, R. McCollum, N. Fujimoto, K. Obata, J. M. Cloutier and J. P. Pelletier, *Lab Invest*, **70**, 807-15 (1994).
4. J. F. Jr, Woessner and Z. Gunja-Smith, *J. Rheumatol*, **27**(Suppl), 99-101 (1991).
5. D. D. Dean, J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier, D. S. Howell and J. F. Jr. Woessner, *J. Clin. Invest.*, **84**, 678-685 (1989).
6. S. Roy, S. Khanna, A. V. Krishnaraju, G. V. Subbaraju, T. Yasmin, D. Bagchi and C. K. Sen, *Antioxid Redox Sign*, **8**, 653-660 (2006).
7. B. Park, S. Prasad, V. Yadav, B. Sung and B. B. Aggarwal, *PLoS One*, **6**, e26943 (2011).
8. K. Sengupta, J. N. Kolla, A. V. Krishnaraju, N. Yalamanchili, C. V. Rao, T. Golakoti, S. Raychaudhuri and S. P. Raychaudhuri, *Boswellia serrata extract. Mol Cell Biochem*, **354**, 189-197 (2011).
9. KHIDI. Health functional food industry development assistance report. Korea Health Industry Development



- Institute, Chungbuk, Korea. p 8 (2011).
10. K. S. Ahn, W. S. Sim and I. H. Kim, *Planta Med.*, **62**(1), 7-9 (1996).
  11. K. S. Ahn, W. S. Sim, I. K. Lee, Y. B. Seu and I. H. Kim, *Planta Med.*, **63**(4), 360-361(1996).
  12. Ammon HRT. *Phytomedicine*, **17**, 862-867 (2010).