



엉겅퀴 뿌리 물 추출물의 류마티스 관절염 동물 모델에 대한 개선 효과

노종현^{1#} · 이현주^{2#} · 이애나³ · 우경완⁴ · 장지훈⁵ · 김선라⁶ · 조현우⁷ · 노세응^{8*} · 정호경^{9†}

Improvement Effect of the Water Extract from the Root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* on Type II Collagen-induced Rheumatoid Arthritis Animal Models

Jong Hyun Nho^{1#}, Hyeun Joo Lee^{2#}, E Na Lee³, Kyeong Wan Woo⁴, Ji Hun Jang⁵, Sun Ra Kim⁶, Hyun Woo Cho⁷, Se Eung Noh^{8*} and Ho Kyung Jung^{9†}

Received: 2020 August 10
1st Revised: 2020 September 7
2nd Revised: 2020 October 23
3rd Revised: 2020 October 30
Accepted: 2020 October 30

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.

ABSTRACT

Background: The roots of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* (RCJ) have been used as traditional medicine in Korea for hematuria and hematemesis. These extracts exert anti-oxidative and anti-inflammatory effects by scavenging for free radical and regulating the inflammatory response. However, the effect of RCJ on rheumatoid arthritis (RA) has not been elucidated. Thus, we evaluated the water extract of RCJ (WRCJ) using type II collagen-induced RA models.

Methods and Results: RA was induced by immunization with type II collagen. All experimental materials were orally administered daily for three weeks. The positive control group was administered with 0.2 mg/kg methotrexate ($n = 7$), while the experimental group was administered with WRCJ (100 or 500 mg/kg, $n = 7$). Serum levels of TNF-alpha, Interleukin 6 (IL-6), and type II collagen IgG (CII) were measured using ELISA. Administration of 500 mg/kg WRCJ decreased the levels of TNF-alpha, IL-6, and CII. Moreover, WRCJ treatment diminished swelling of hind legs and infiltration of inflammatory cells in RA models' synovial membrane.

Conclusions: These results indicate that WRCJ could improve RA, reduce inflammatory indicators and synovial inflammation. However, further experiments are required to determine how WRCJ can influence the signal transduction pathway in RA.

Key Words: *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, Autoimmune Disease, Rheumatoid Arthritis.

서 언

제2형 콜라겐에 의해 유도된 관절염 동물모델은 사람의 류마티스 관절염과 비슷한 특징을 가지기 때문에 흔히 사용되며 (Williams, 2004), 류마티스 관절염은 남성보다 여성의 발병율

이 높은 것으로 보고되었다 (Symmons, 2002).

활막 조직의 염증 세포 침윤과 부종, 관절손상과 같은 특징을 가지는 자가면역 질환으로 (Scott *et al.*, 2001), anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs)의 유무에 따른 병인성에 차이가 있고 류마티스 관절염 환자의 67%가 ACPAs를

#Jong Hyun Nho and Hyeun Joo Lee are contributed equally to this paper

†Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2813 (E-mail) nikome@naver.com

*Co-corresponding author: (Phone) +82-61-860-7777 (E-mail) onrehab@wonkwang.ac.kr

¹한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

²한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

³한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁴한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁵한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁶한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁷한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁸원광대학교 통합의료한방병원 재활의학과 원장 / Director, Department of Rehabilitation Medicine, Jangheung Integrative Medicine Center, Wonkwang University College of Medicine, Jangheung 59338, Korea.

⁹한국한의약진흥원 연구원 / Researcher, National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

가지고 있어 발병 초기 인자로 흔히 사용될 뿐만 아니라 ACPAs가 양성일 경우 음성보다 질병의 발달이 빠르다고 알려져 있다 (Nishimura *et al.*, 2007).

발병기전에 관한 여러 연구들이 늘어나면서 알려진 점은 interleukin 6 (IL-6)와 tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)와 같은 염증매개 단백질이 활막부위의 염증반응에 관여한다고 보고되어 있고 이에 IL-6의 발현을 억제하는 tocilizumab과 TNF alpha 억제제인 infliximab가 치료에 흔히 사용된다 (Feldmann *et al.*, 1996; Cheon *et al.*, 2015).

류마티스 관절염의 기전은 정확히 밝혀지지 않았지만 면역억제를 매개로 하는 염증반응이 발병에 기인한다고 알려져 있고 치료에 주로 사용되는 약물인 disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)는 강력한 항염증 작용을 통해 염증매개물질을 억제하지만 폐손상, 간독성 등의 부작용이 동반된다고 보고되어 (Brown *et al.*, 2016), 부작용이 적고 치료효과를 가지는 약용작물을 찾는 연구가 늘어나고 있다 (Kim *et al.*, 2009; Kwon and An, 2013; Kim *et al.*, 2013; Seo and Jeong, 2014).

영경귀 (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 flavonoid 계열의 화합물인 apigenin, myricetin, kaemferol, pectolinam 등이 함유되어있다고 알려져 있으며 (Kim and Kim, 2003), 포도당 흡수 증진 작용, 항산화 작용 및 간섬유화 개선 효능이 있는 것으로 보고되었다 (Park *et al.*, 2004; Lee and Moon, 2005; Kim and Song, 2014). 영경귀의 유효성분 중 하나인 chlorogenic acid는 lipopolysaccharide로 자극된 마우스 대식세포에서 염증반응에 관련된 interleukin-1 beta, interleukin-6, TNF-alpha, cyclooxygenase-2의 단백질 발현량을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있고 (Hwang *et al.*, 2014), syringin은 lipopolysaccharide로 유도된 염증 반응에서 TNF-alpha의 생성을 차단하는 효과를 가진다 (Cho *et al.*, 2001). 또한 linarin과 pectolinarin은 전염증 사이토카인의 생성을 감소시켜 항염증 작용을 나타내는 것으로 보고되어있다 (Lim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2016).

전염증성 사이토카인은 류마티스 관절염의 발병과 진행에서 가장 중요한 인자로 보고되어있어 (Cheon *et al.*, 2015) 위와 같은 효과를 가진 유효성분들을 함유하는 영경귀는 염증성 질환에서 항염증 효과를 가질 가능성이 클 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 영경귀는 뿌리와 지상부의 유효성 차이가 보이기 때문에 부위별로 유효성을 평가하는 것이 중요할 것으로 보인다 (Lee *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2015).

위와 같은 이유로 본 연구에서는 영경귀 뿌리 물 추출물이 제2형 콜라겐으로 유도된 류마티스 관절염 동물모델에서 어떤 개선효과를 나타내는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료와 시험 물질의 제조

본 실험에 사용한 영경귀 (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*) 뿌리는 식품의약품안전처의 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준 (good manufacturing practice, GMP)을 인증 받은 제품을 광명당약도매 (onherb, Gwangju, Korea)에서 구입하였으며, 세척한 후 일주일 동안 대형 건열 건조기 (SAM-DR1700, Samgong Co., Ltd., Busan, Korea)에서 50 °C 조건으로 건조하였다.

건조된 시료 409 g을 완전히 분쇄하고 시료 무게의 10 배에 해당하는 물을 넣은 뒤 환류 냉각추출방법을 통해 105°C에서 5 시간 동안 2 회 반복, 추출했다. 반복추출을 거친 추출물은 대형 회전감압농축기 (NVC-2200, Eylea, Tokyo, Japan)를 통해 55°C에서 농축하였고, 농축이 끝난 추출물은 filter paper (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용해 여과한 뒤 동결건조기 (LYOPH-PRIDE 20R, ilShinBioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 이용해 건조하였다.

본 실험 조건에서 시험물질은 250 g을 수득하여 약 61.1%의 수율을 확인하였고 건조된 파우더는 0.5% CMC (carboxymethyl cellulose, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 뒤 사용했다.

2. 영경귀 뿌리의 성분 분석

성분 분석을 위해 LC-20AD pump, CTO-20A column oven, DGU-20A3 degasser, SPD-20A UV detector, SIL-20AC autoinjector로 구성된 UFLC XR (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 이용하였고, ESI interface를 통해 IT TOF mass spectrometer (LC-IT-TOF MS, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 분석하였다. Column은 Capcell Pak IF C18 (2 μm, 2.0 mm × 100 mm, Osaka soda Co., Ltd., Osaka, Japan)를 사용하였으며, 분석 시 column 온도는 40°C로 설정하였다. 분석 용매는 0.1% 포름산을 포함한 정제수 (용매 A)와 0.1% 포름산을 포함한 아세트나이트릴 (용매 B)을 사용하여 총 20 분간 0.3 ml/min 유속으로 분석하였다 (Table 1).

성분 분석에 사용된 표준물질은 4-caffeoyl quinic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), 3,5-dicaffeoylquinic acid (Biopurify Phytochemicals Ltd., Chengdu, China), diosmin (Tauto Biotech Co., Ltd., Zhangjiang, China), 4,5-dicaffeoylquinic acid, linarin, pectolinarin (ChemFaces Biochemical Co., Ltd., Wuhan, China)를 사용하였고, chlorogenic acid, rutin, syringin, luteolin 및 rutinolide는 직접 분리하여 구조가 동정된 화합물을 사용했다.

Table 1. LC-IT-TOF MS conditions for the water extract from the root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

| HPLC condition | | | |
|---|--|-------|-------|
| Column | Capcell pak IF C18 (2 μ m, 2.0 mm \times 100 mm) | | |
| Flow rate | 0.3 ml/min | | |
| Injection volume | 1.0 μ l | | |
| Column temperature | 40°C | | |
| | Time (min) | A (%) | B (%) |
| Mobile phase | 0 | 100 | 0 |
| | 25 | 50 | 50 |
| A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile | | | |
| MS condition | | | |
| Ionization mode | ESI, positive | | |
| Capillary voltage (kV) | 4.5 | | |
| CDL voltage (V) | 10 | | |
| Detector voltage (kV) | 1.67 | | |
| CDL temperature | 200°C | | |
| Heat block temperature | 200°C | | |
| Nebulizing gas | N ₂ , 1.5 l/min | | |
| Collision gas | Ar | | |

3. 실험 동물 및 처치

본 실험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제 13023호)에 근거한 한국한의약진흥원 한약자원개발본부의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었으며 (승인번호: NIKOM-2017-003), 실험에 사용된 수컷 6 주령 DBA/1 마우스는 오리엔트 바이오 (Jeongeup, Korea)에서 구입하였고 그룹당 7 마리 씩 다섯 그룹으로 분리했다.

Immunization grade bovine type II collagen (Chondrex Inc., Redmond, WA, USA)은 면역보조제인 complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma- Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 incomplete Freund's adjuvant (IFA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 사용했다.

류마티스 관절염의 유도는 먼저 bovine type II collagen을 CFA에 1:1 비율이 되도록 충분히 섞어 마우스 꼬리 기저부에 100 μ l를 주입하고, 일주일 뒤 IFA에 1:1 비율로 녹인 bovine type II collagen을 마우스 꼬리 기저부에 100 μ l를 주입해 류마티스 관절염을 유도했다.

정상대조군 (normal control)과 음성대조군 (negative control)을 제외한 양성대조군 (positive control) 그룹은 0.2 mg/kg의 농도로 methotrexate를 3주간 경구투여 했으며, 영경귀 뿌리 물 추출물 투여 그룹은 3주 동안 100 mg/kg (WRCJ 100 mg/kg) 또는 500 mg/kg (WRCJ 500 mg/kg) 농

도로 경구투여했다. 실험이 끝난 뒤, IACUC의 실험동물 관리 기준에 따라 이산화탄소를 과호흡시켜 실험동물의 안락사를 유도했다.

4. Hematoxylin과 eosin 염색

실험동물로부터 분리된 다리는 10% neutral buffered formalin (HT501128, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 이를 동안 고정된 뒤 조직처리 과정을 통해 파라핀으로 검체를 제작하였으며, 검체는 활막과 관절이 뚜렷하게 보이도록 5 μ m 두께로 조직 슬라이드를 제작해 Dako Mayer's Hematoxylin (Agilent Technologies Inc., Santa clara, CA, USA)과 Eosin Y (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용한 hematoxylin and eosin 염색을 통해 광학현미경으로 관찰했다.

5. Scoring 및 비장 무게 측정

류마티스 관절염 지수는 류마티스 관절염이 유도된 후 일주일마다 진행하였으며, 각각 세 번씩 독립적으로 측정했다. 스코어는 Endale 등의 방법을 참고했으며 적용된 수치는 다음과 같다 (Endale *et al.*, 2013, symptomless; 0, erythema; 2, mild swelling and erythema; 4, mild swelling, erythema from the tarsals to the ankle; 6, moderate swelling, erythema from the metatarsal joints to the ankle; 8, severe swelling and erythema from the foot to the ankle; 10).

조직 병리 지수는 보고된 방법을 참고해 활막 내 염증 반응을 현미경으로 관찰했고 적용된 수치는 다음과 같다 (Nishikawa *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011, normal; 0, cell infiltration in synovial membrane; 1, cartilage erosion; 2, erosion of subchondral bone; 4, loss of joint integrity and ankylosis; 5).

6. 염증매개인자 및 항체분석

혈청에 존재하는 염증매개인자인 IL-6와 TNF-alpha의 비율을 측정하기 위해 ELISA를 수행했으며, 실험동물로부터 전혈을 얻은 뒤 BD vacutainer™ SST tube (Thermo Fisher Scientific Inc., Whaltam, MA, USA)에 넣어 실온에 10분간 방치하고 4,000 rpm 4°C 조건에서 10분간 원심분리 하였다.

분리된 혈청은 Mouse IL-6 quantikine ELISA (M6000B, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA), Mouse TNF-alpha quantikine ELISA (MTA00B, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)와 Anti-mouse type II collagen IgG antibody assay kit (2036, Chondrex Inc., Redmond, WA, USA)를 사용해 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 수행하였다.

7. 통계처리

통계처리는 statistical package for the social sciences (SPSS, IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하여 평균값과 표준편차를 구했고 실험군 간의 유의적인 차이를 검증하기 위해 일원배치 분산분석을 수행한 후, Tukey-Kramer Multiple Comparison Test를 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 통계적인 차이를 검증했다.

결과 및 고찰

1. 엉겅퀴 뿌리 물 추출물의 LC-MS 분석

시험물질은 LC ESI-IT-TOF/MS를 이용하여 분석하였으며 총 10 개의 주요 peak를 확인했다.

각 peak들의 기초정보는 Table 2에 표기했으며 (Table 2), 이러한 결과를 바탕으로 각각의 표준품, retention time, 분자량 및 선행연구와 비교하여 chlorogenic acid (1) (Lee *et al.*, 2019), 4-caffeoyl quinic acid (2) (Park *et al.*, 2019), syringin (3) (Li *et al.*, 2019), 3,5-dicafeoylquinic acid (4) (Lee *et al.*, 2019), rutin (5) (Lee *et al.*, 2018), luteolin

rutinoside (6) (Hassan *et al.*, 2019), 4,5-dicafeoylquinic acid (7) (Park *et al.*, 2019), diosmin (8) (Adouani *et al.*, 2013), linarin (9), pectolinarin (10) (Ganzera *et al.*, 2005)으로 확인했다 (Fig. 1).

2. 다리 부종에 대한 엉겅퀴 뿌리 물 추출물의 효과

실험 동물 모델에서 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*) 뿌리 물 추출물 (WRCJ)이 다리의 부종과 같은 형태학적인 염증 반응에 어떠한 효과를 나타내는지 확인하기 위해 실험을 진행했으며, 본 실험에 적용한 시험물질의 농도는 약용자원을 이용한 여러 선행 실험결과를 바탕으로 결정했다 (Fujita *et al.*, 2001; Watcho *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2012).

류마티스 관절염 유도 1 주일 후 양성대조군 (0.2 mg/kg methotrexate, positive control) 그룹은 음성대조군 (negative control) 그룹과 비교하여 다리에 부종이 개선되는 경향이 나타나기 시작했으며, 3 주차에 가서야 양성대조군과 엉겅퀴 뿌리 물 추출물 500 mg/kg 투여군은 다리의 부종이 유의적으로 개선되는 것으로 확인되었다 (Fig. 2A and 2B).

Table 2. Peak identifications for analysis of main compounds by LC-IT-TOF MS in *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

| Peak number | Compound name | Retention time (min) | Molecular formula | Detected ion | References |
|-------------|--------------------------|----------------------|---|--|------------------------------|
| 1 | Chlorogenic acid | 7.27 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 377.0652 [M+Na] ⁺ , 353.0739 [M-H] ⁻ | Lee <i>et al.</i> , 2019 |
| 2 | 4-Caffeoyl quinic acid | 7.49 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 377.0656 [M+Na] ⁺ , 353.0743 [M-H] ⁻ | Park <i>et al.</i> , 2019 |
| 3 | Syringin | 7.85 | C ₁₇ H ₂₄ O ₉ | 395.1127 [M+Na] ⁺ | Li <i>et al.</i> , 2019 |
| 4 | 3,5-Dicafeoylquinic acid | 9.55 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 515.0966 [M-H] ⁻ | Lee <i>et al.</i> , 2019 |
| 5 | Rutin | 11.07 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 611.1302 [M+H] ⁺ , 609.1214 [M-H] ⁻ | Lee <i>et al.</i> , 2018 |
| 6 | Luteolin rutinoside | 11.79 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 593.1591 [M-H] ⁻ | Hassan <i>et al.</i> , 2019 |
| 7 | 4,5-Dicafeoylquinic acid | 11.98 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 515.1168 [M-H] ⁻ | Park <i>et al.</i> , 2019 |
| 8 | Diosmin | 12.32 | C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ | 609.1529 [M+H] ⁺ , 607.1436 [M-H] ⁻ | Adouani <i>et al.</i> , 2013 |
| 9 | Linarin | 14.05 | C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄ | 593.1591 [M+H] ⁺ , 591.1447 [M-H] ⁻ | Ganzera <i>et al.</i> , 2005 |
| 10 | Pectolinarin | 14.18 | C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅ | 623.1676 [M+H] ⁺ | Ganzera <i>et al.</i> , 2005 |

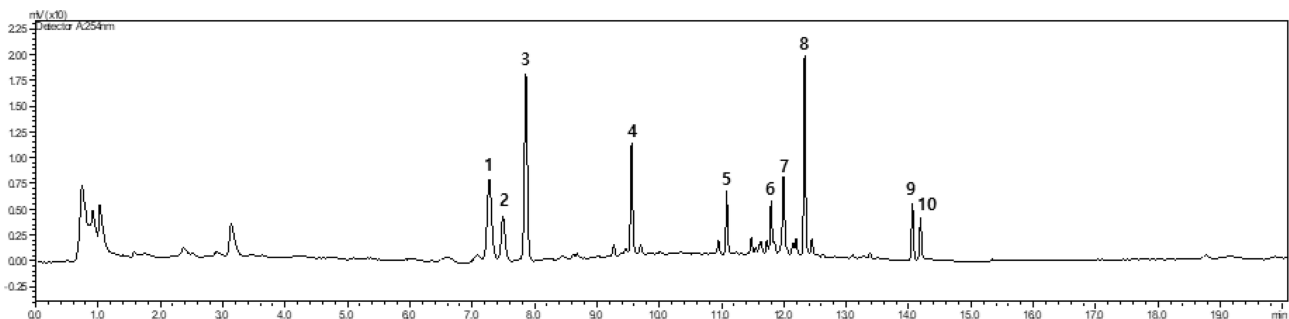


Fig. 1. LC chromatogram of the water extract from the root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. (1; chlorogenic acid, 2; 4-caffeoyl quinic acid, 3; syringin, 4; 3,5-dicafeoylquinic acid, 5; rutin, 6; luteolin rutinoside, 7; 4,5-dicafeoylquinic acid, 8; diosmin, 9; linarin, 10; pectolinarin)

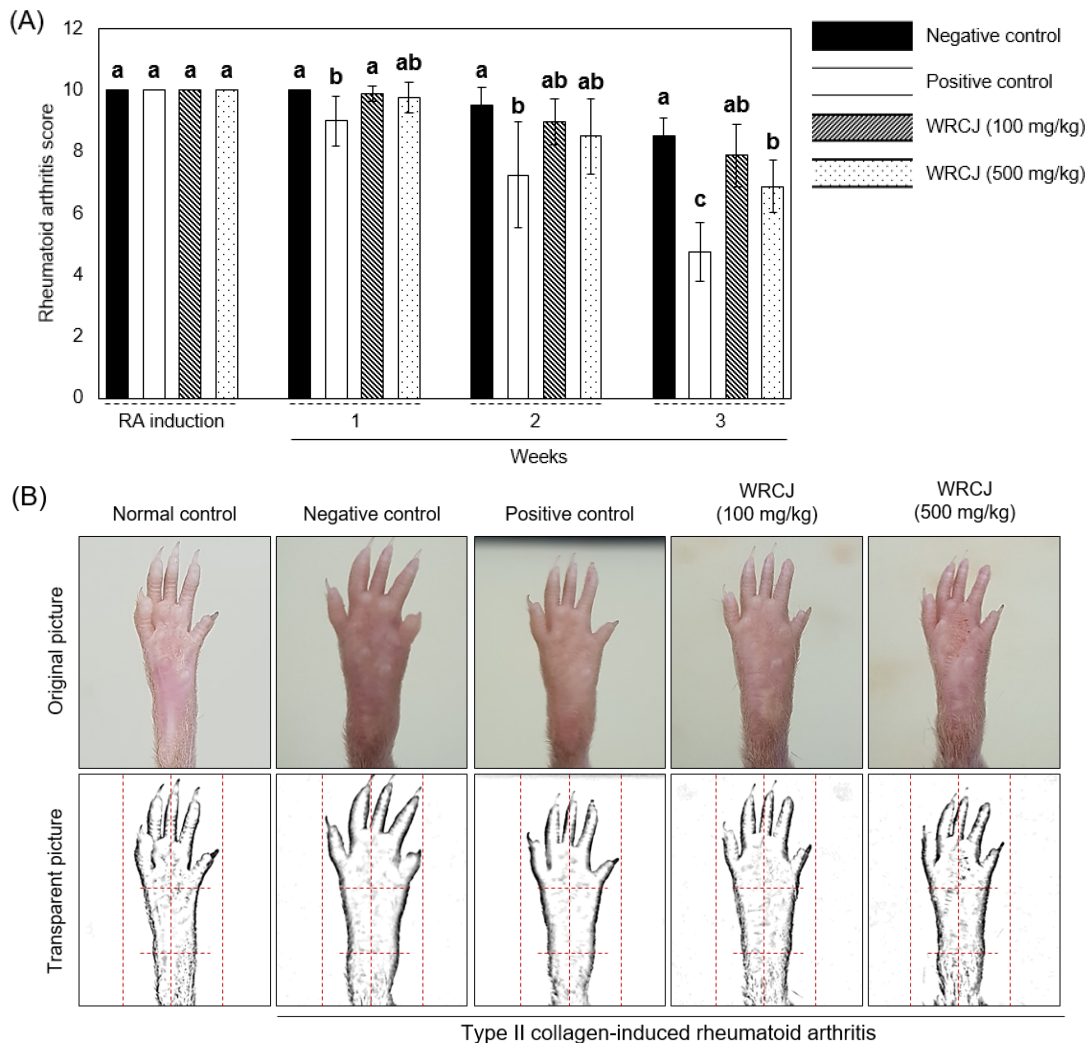


Fig. 2. Improvement effect of WRCJ on type II collagen-induced swelling of hind legs. Mice were separated 5 group (normal control, negative control; type II collagen-induced rheumatoid arthritis, CIA, positive control; CIA + 0.2 mg/kg methotrexate, CIA + 100 mg/kg WRCJ, CIA + 500 mg/kg WRCJ, n = 7). (A) Rheumatoid arthritis score was weekly assessed beginning from 14 days. Examiners for three times per week. Assessment as follows: symptomless; 0, erythema; 2, mild swelling and erythema; 4, mild swelling, erythema from the tarsals to the ankle; 6, moderate swelling, erythema from the metatarsal joints to the ankle; 8, severe swelling and erythema from the foot to the ankle; 10. (B) Morphological image of hind legs. Data are presented as means ± SEM (n = 7). Statistical significance was indicated for weekly. *p < 0.05, versus negative control group by One-way ANOVA with Tukey-Kramer Multiple Comparison Test. CIA, type II collagen induced rheumatoid arthritis; WRCJ, water extracts derived from the root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

활막을 구성하는 활막액은 전염증성 매개인자가 존재하여 단핵구, 대식세포와 같은 세포들과 상호작용함에 따라 면역반응에 쉽게 반응하며 (Burmester *et al.*, 1983), 이러한 상호작용은 관절의 부종과 직접적으로 연결된 보고되어있다 (Song *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2018).

본 실험조건에서 영경귀 뿌리 물 추출물을 100 또는 500 mg/kg의 농도로 3 주간 투여했을 때, 100 mg/kg 투여동물은 type II 콜라겐에 의한 다리 부종을 개선하지 못했고 500 mg/kg 투여동물은 유의적으로 부종을 개선시키는 것으로 나타났는데 이는 영경귀 뿌리 물 추출물이 콜라겐에 의해 유도된

활막의 염증반응에 이로운 영향을 미치는 것으로 사료될 뿐만 아니라 투여 농도 차이에 의해 염증매개물질 분비에 미치는 영향이 다를 것으로 사료되어 활막의 조직학적인 분석과 류마티스 관절염에 관여하는 혈액 인자를 측정하였다.

3. 활막내 염증세포 침윤에 대한 영경귀 뿌리 물 추출물의 개선효과

실험동물로부터 얻어진 조직을 hematoxylin과 eosin 염색 및 조직 처리 과정을 통해 육안으로 확인한 결과, 음성대조군은 정상대조군에 비해 활막의 염증이 증가되는 것으로 나타났

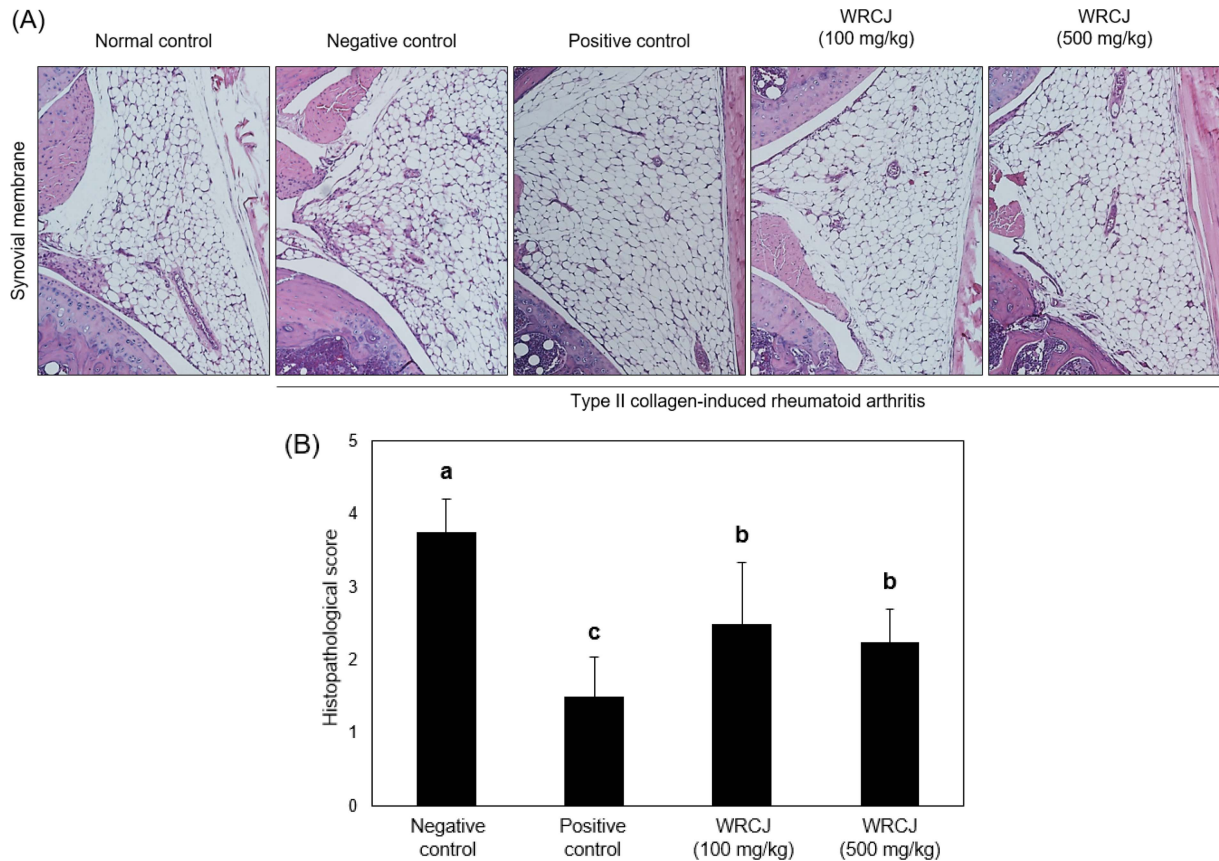


Fig. 3. Improvement effect of WRCJ on infiltration of inflammatory cell on synovial membrane. Mice were separated 5 group (normal control, negative control; type II collagen-induced rheumatoid arthritis, CIA, positive control; CIA + 0.2 mg/kg methotrexate, CIA + 100 mg/kg WRCJ, CIA + 500 mg/kg WRCJ, $n = 7$). (A) Representative images were stained by hematoxylin and eosin (H & E) staining (B) Histological score determined on H&E stained sections in different groups. Histologic scoring of inflammation and bone erosion was performed by three independent observers. * $p < 0.05$, versus negative control group. Statistical analysis for histological score was conducted using One-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test. CIA, type II collagen induced rheumatoid arthritis; WRCJ, Water extracts derived from the root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

으며, 양성대조군과 500 mg/kg 농도의 엉겅퀴 뿌리 물 추출물 투여군은 유의적으로 제2형 콜라겐 주입에 의한 활막염증을 개선하는 것으로 나타났지만 100 mg/kg 엉겅퀴 뿌리 물 추출물 투여군은 유의적인 효과가 확인되지 않았다 (Fig. 3A and 3B).

제2형 콜라겐은 DBA/1 마우스에서 조직학적으로 활막의 염증을 일으키는 것으로 보고되어 있고 이러한 염증 반응은 염증매개물질인 IL-6가 필수적으로 필요한 것으로 알려져 있다 (Srirangan and Choy, 2010). 또한 염증반응에서 IL-6는 B 세포의 분화와 항체 생성에 관여하며, T 세포의 분화와 증식을 자극함에 따라 interleukin 17을 생성하고 호중구를 혈관으로부터 조직으로 이동시킨 뒤 ROI (reactive oxygen intermediates)와 단백질 분해효소를 방출하여 관절을 손상시킨다 (Lally *et al.*, 2005; Dienz *et al.*, 2009).

본 실험에서 500 mg/kg 농도의 엉겅퀴 뿌리 물 추출물은

음성대조군에서 나타난 활막의 염증세포 침윤을 개선하는 것으로 나타남에 따라 엉겅퀴 뿌리 물 추출물이 동물 모델에서 활막의 염증에 관여하는 염증매개인자의 발현에 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 사료되어 이에 관련한 여러 인자를 측정했다.

4. 혈액 인자에 대한 엉겅퀴 뿌리 물 추출물의 효과 및 비장 무게 측정

비장은 면역에 관여하는 주요 장기로 체내 전반적인 면역 기능에 영향을 미치며 류마티스 관절염 동물모델과 임상적으로 염증반응에 의해 무게가 증가되는 것으로 보고되었다 (Bedoya *et al.*, 2015; Serag El-Dien *et al.*, 2016). 이와 같은 근거에 따라 동물모델에서 비장의 절대중량을 측정된 결과 정상대조군은 0.070 ± 0.014 g, 음성대조군은 0.155 ± 0.031 g으로 약 두 배 이상 유의적으로 증가되었다. 아울러 양성대

조균은 비장의 절대중량이 0.088 ± 0.013 g으로 감소되었을 뿐만 아니라 100 또는 500 mg/kg 영경귀 뿌리 물 추출물 투여군은 각각 0.103 ± 0.015 g, 0.088 ± 0.015 g으로 감소되어 영경귀 뿌리 물 추출물은 음성대조군과 비교하여 비장의 중량 증가를 유의적으로 개선시키는 것으로 나타났다 (Fig. 4A).

류마티스 관절염이 유발된 환자의 혈청과 활막액에 제2형 콜라겐에 대한 자가항체가 증가되는 것이 류마티스 관절염의 혈액 지표로 이용될 뿐만 아니라 (Jung *et al.*, 2003), 환자 체내의 염증 활성의 정도를 측정하는 지표로 사용됨에 따라 (Kim *et al.*, 2000) 영경귀 뿌리 물 추출물이 제2형 콜라겐 자가항체 생성을 감소시킬 수 있는지 알아보기 위해 실험을 진행했다.

혈청에 존재하는 제2형 콜라겐 자가항체를 측정했을 때 음성대조군은 109.4 ± 16.5 pg/ml 로 증가되었고, 양성대조군은 45.9 ± 16.3 pg/ml 로 유의적으로 감소되었을 뿐만 아니라 100 또는 500 mg/kg 농도의 영경귀 뿌리 물 추출물을 투여한 실험

군은 각각 24.7 ± 11.0 , 17.2 ± 7.7 pg/ml 로 영경귀 뿌리 물 추출물 투여시 제2형 콜라겐 자가항체 농도를 유의적으로 개선시켰다 (Fig. 4B).

양성대조물질인 methotrexate는 aminomidazole carboximide ribonucleoide, dihydroflolate reductase 및 transformylase와 같은 염증 매개 단백질을 억제함에 따라 세포 외부의 adenosine을 증가시키고 pyrimidine의 합성을 저해하며, TNF-alpha와 interleukin 6의 생성을 억제하여 염증 반응을 억제한다고 알려져 있다 (Whittle and Hughes, 2004). 이러한 이유를 근거로 하여 영경귀 뿌리 물 추출물이 염증반응을 억제하는 역할을 통해 TNF-alpha와 interleukin-6의 생성을 개선할 수 있는지 알아보기 위해 실험을 진행했다.

혈청내 TNF-alpha의 수준을 측정해본 결과 음성대조군은 103.6 ± 14.7 pg/ml 로 정상대조군과 비교하여 증가하였으며 양성대조군은 36.5 ± 6.4 pg/ml, 100 또는 500 mg/kg 영경귀 뿌리 물 추출물은 각각 67.5 ± 9.2 pg/ml 와 53.0 ± 8.5 pg/ml

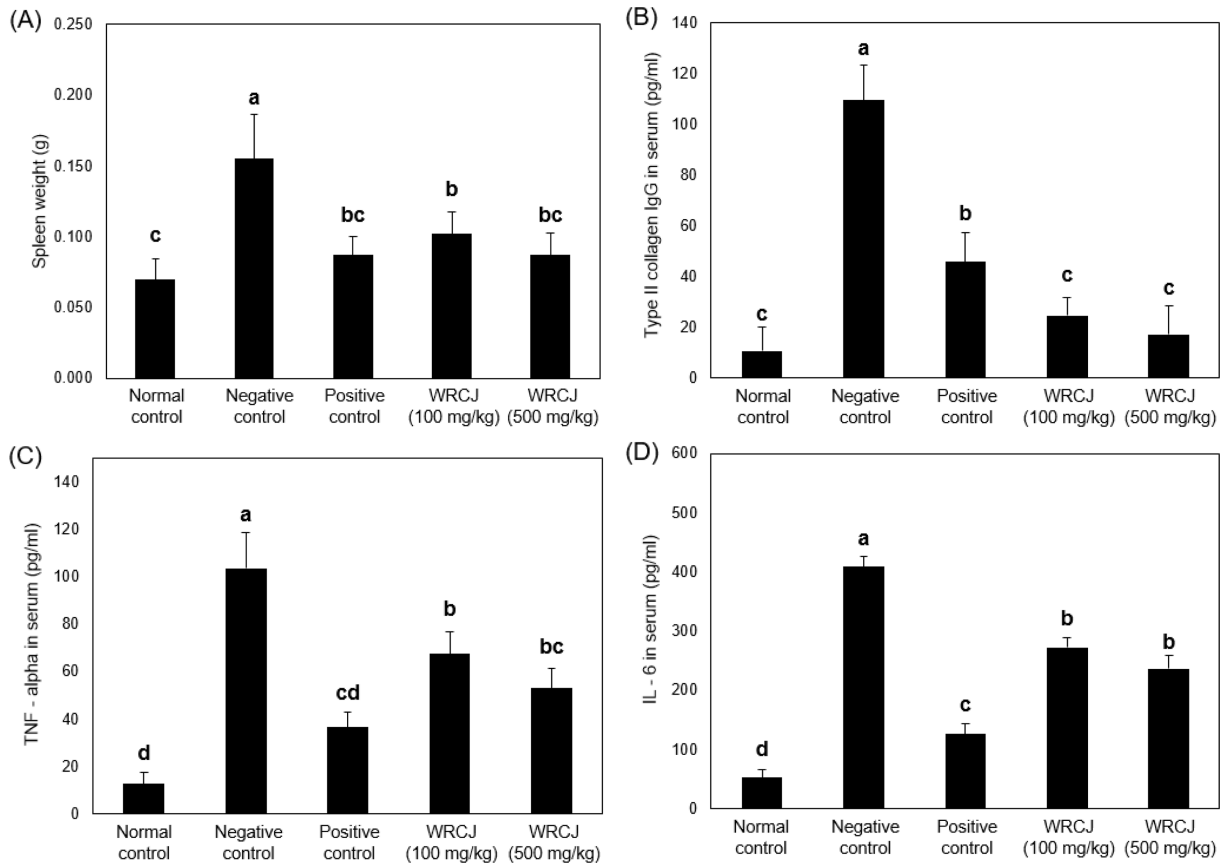


Fig. 4. WRCJ administration decreased the serum level of IL-6, TNF-alpha, type II collagen IgG, and spleen weight on type II collagen-induced rheumatoid arthritis models. Mice were separated 5 group (normal control, negative control; type II collagen-induced rheumatoid arthritis, CIA, positive control; CIA + 0.2 mg/kg methotrexate, CIA + 100 mg/kg WRCJ, CIA + 500 mg/kg WRCJ, $n = 7$). (A); Spleen weight. (B, C, D) type II collagen IgG, TNF-alpha, and IL-6 in serum are analyzed by ELISA. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 7$). # $p < 0.05$, versus normal control group; * $p < 0.05$, versus negative control group. Between groups comparisons were conducted using One-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test. CIA, type II collagen induced rheumatoid arthritis; WRCJ, Water extracts derived from the root of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

로 나타났다 (Fig. 4C).

Interleukin 6의 혈청 농도는 음성대조군이 408.7 ± 18.5 pg/ml, 양성대조군은 126.6 ± 17.5 pg/ml, 100 또는 500 mg/kg 엉겅퀴 뿌리 물 추출물은 각각 273.0 ± 16.3 pg/ml 와 236.5 ± 21.6 pg/ml 로 나타났다 (Fig. 4D).

본 실험 실험결과에서 양성대조군을 포함한 모든 실험군은 모두 유의적으로 혈청내 TNF-alpha와 interleukin 6 수준을 개선시킨 것으로 나타났다. 류마티스 관절염에서 가장 중요한 염증매개인자로 보고되어 있는 TNF-alpha와 interleukin 6는 단핵구와 호중구의 침윤을 증가시켜 염증반응을 조절하고 collagenase와 stromelysin를 포함한 단백질 분해효소의 생성을 증가시킨다 (Saxne *et al.*, 1988; Shingu *et al.*, 1993).

체내에서 생성되는 TNF-alpha는 대부분 대식세포와 T 림프구에 의해 만들어지며, 혈관 내피에서 내피백혈구와 상호작용을 통해 Intercellular adhesion molecule 1과 Vascular cell adhesion molecule 1을 포함한 세포부착분자의 발현을 증가시켜 조직상태를 악화시킨다 (Bradley, 2008). 또한 Interleukin-6는 염증 초기단계에서 파골세포 활성화를 통해 관절을 파괴하고 항체를 생성하는 B세포의 성숙에 작용하여 류마티스 관절염의 병인에 기인한다 (Tanaka *et al.*, 2014).

본 실험 조건에서 양성대조군인 0.2 mg/kg methotrexate와 엉겅퀴 뿌리 물 추출물은 농도의존적으로 혈청에서 염증매개인자인 TNF-alpha, interleukin 6 및 제2형 콜라겐 자가항체의 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났지만, 100 mg/kg 엉겅퀴 뿌리 물 추출물은 혈중 염증매개인자를 유의적으로 감소시킨것과 반해 type II 콜라겐 투여에 의한 다리의 부종을 개선하지 못했다. 이는 류마티스 관절염 동물모델에서 500 mg/kg 엉겅퀴 뿌리 물 추출물의 섭취가 유의적으로 다리의 부종을 개선한 것으로 보아 뚜렷한 염증반응 억제 효과를 나타내기 위해서 500 mg/kg 농도에 가까운 유효농도가 되어야만 이로운 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

위와 같이 고농도의 엉겅퀴 뿌리 물 추출물은 류마티스 관절염 동물 모델에서 양성대조군으로 사용된 0.2 mg/kg methotrexate에 비해 류마티스 관절염 개선 효과적은 적었으나 체내의 염증반응 억제를 통해 염증매개물질의 생성 및 관절의 부종을 개선함을 통해 류마티스 관절염의 병리학적 특징을 감소시키는 것으로 보이지만, 이를 자세히 확인하기 위해 엉겅퀴 뿌리의 유효성분 분석과 조직 및 세포수준에서 어떤 단백질 신호전달 경로를 통해 염증반응을 개선하는지 밝히기 위해 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

Adouani I, Du M and Hang TJ. (2013). Identification and determination of related substances in diosmin bulk drug and

pharmaceutical formulations by HPLC and HPLC-MS. *Chromatographia*. 76:499-508.

Bedoya ME, Ceccato F and Paira S. (2015). Spleen and liver enlargement in a patient with rheumatoid arthritis. *Reumatología Clínica*. 11:227-231.

Bradley JR. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. 214:149-160.

Brown PM, Pratt AG and Isaacs JD. (2016). Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 12:731-742.

Burmester GR, Dimitriu-Bona A, Waters SJ and Winchester RJ. (1983). Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts. *Scandinavian Journal of Immunology*. 17:69-82.

Cheon YH, Kim HO, Suh YS, Hur JH, Jo WY, Lim HS, Hah YS, Sung MJ, Kwon DY and Lee SI. (2015). Inhibitory effects for rheumatoid arthritis of dietary supplementation with resveratrol in collagen-induced arthritis. *Journal of Rheumatic Diseases*. 22:93-101.

Cho JY, Nam KH, Kim AR, Park JS, Yoo ES, Baik KU, Yu YH and Park MH. (2001). *In-vitro* and *in-vivo* immunomodulatory effects of syringin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53: 1287-1294.

Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, Briso EM, Charland C, Leonard WJ, Ciliberto G, Teuscher C, Haynes L and Rincon M. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 206:69-78.

Endale M, Lee WM, Kwak YS, Kim NM, Kim BK, Kim SH, Cho JY, Kim S, Park SC, Yun BS, Ko DH and Rhee MH. (2013). Torilin ameliorates type II collagen-induced arthritis in mouse model of rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology*. 16:232-242.

Feldmann M, Brennan FM and Maini RN. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*. 14:397-440.

Fujita H, Yamagami T and Ohshima K. (2001). Fermented soybean-derived water-soluble Touchi extract inhibits α -glucosidase and is antiglycemic in rats and humans after single oral treatments. *The Journal of Nutrition*. 131:1211-1213.

Ganzeria M, Pöcher A and Stuppner H. (2005). Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*. 16:205-209.

Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ and Xu J. (2018). Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*. 6:15. <https://www.nature.com/articles/s41413-018-0016-9> (cited by 2020 Aug 10).

Hassan WHB, Abdelaziz S and Yousef HM. (2019). Chemical composition and biological activities of the aqueous fraction of *Parkinsonia aculeata* L. growing in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*. 12:377-387.

Hwang SJ, Kim YW, Park YH, Lee HJ and Kim KW. (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation Research*. 63:81-90.

- Jung YO, Hong SJ and Kim HY.** (2003). Role of immune response to type II collagen in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immune Network*. 3:1-7.
- Kim BM, Lee JH, Seo MJ, Eom SH and Kim WK.** (2016). Linarin down-regulates phagocytosis, pro-inflammatory cytokine production, and activation marker expression in RAW264.7 macrophages. *Food Science and Biotechnology*. 25:1437-1442.
- Kim MS and Song JH.** (2014). Effects of *Herba Cirsii* extracts on glucose uptake in OP9 cells. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 28:195-199.
- Kim SJ and Kim GH.** (2003). Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. *Journal of Food Sciences and Nutrition*. 8:330-335.
- Kim WJ, Moon BC, Ji YU, Lee YM and Kim HK.** (2013). Genetic diversity of the original plant for Taraxaci Herba, *Taraxacum* spp. by the analysis of AFLP. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:247-254.
- Kim WU, Woo WH, Park W, Kang YM, Kim SI, Park JH, Lee SS, Joo YS, Min JK, Hong YS, Lee SH, Park SH, Cho CS and Kim HY.** (2000). IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 27:575-581.
- Kim YO, Lee SW and Lee SE.** (2009). Effects of *Achyranthes japonica* on carrageenan-induced arthritis rat model. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:470-474.
- Kwon OG and An HD.** (2013). Articular cartilage protective effects of Kangwhaldoche-tang(Qianghuodaozhi-tang) aqueous extracts on the adjuvant-induced rat rheumatoid arthritis. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 23:49-61.
- Lally F, Smith E, Filer A, Stone MA, Shaw JS, Nash GB, Buckley CD and Rainger GE.** (2005). A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatology*. 52:3460-3469.
- Lee HJ, Jeong DE, Gang JE, Sim MO, Seong TK, Woo KW, An BK, Jung HK and Cho HW.** (2018). Quantitative analysis of chemical composition and *in vivo* anti-oxidant and anti-inflammatory properties of *Asparagus oligoclonus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 49:138-144.
- Lee HJ, Sim MO, Woo KW, Jeong DE, Jung HK, An BK and Cho HW.** (2019). Antioxidant and antimelanogenic activities of compounds isolated from the aerial parts of *Achillea alpina* L. *Chemistry and Biodiversity*. 16:e1900033. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.201900033> (cited by 2020 Aug 10).
- Lee JJ and Moon JY.** (2005). Antioxidant property of aqua-acupuncture solution from *Cirsium japonicum*. *Korean Journal of Acupuncture*. 22:57-65.
- Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Choi DS and Wang MH.** (2006). Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 38:571-576.
- Li X, Kim KW, Oh HC, Liu X and Kim YC.** (2019). Chemical constituents and an antineuroinflammatory lignan, savinin from the roots of *Acanthopanax henryi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019:1856294. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2019/1856294/> (cited by 2020 Aug 10).
- Lim H, Son KH, Chang HW, Bae KW, Kang SS and Kim HP.** (2008). Anti-inflammatory activity of pectolinarigenin and pectolinarin isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31:2063-2067.
- Nishikawa M, Myoui A, Tomita T, Takahi K, Nampei A and Yoshikawa H.** (2003). Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis and Rheumatology*. 48:2670-2681.
- Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuij G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM, Kamae I and Kumagai S.** (2007). Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine*. 146:797-808.
- Park MH, Kim DY, Jang HJ, Jo YH, Jeong JT, Lee DY, Baek NI, Ryu HW and Oh SR.** (2019). Analysis of polyphenolic metabolites from *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. and regional comparison in Korea. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 62:433-439.
- Park SK, Lee EJ, Khil JH, Bae HS, Hong MC and Shin MK.** (2004). *Cirsii Japonici* herba extract decreases the dimethyl-nitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 18:413-418.
- Patel SB, Santani D, Shah MB and Patel VS.** (2012). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of *Bryonia Laciniosa* seed extract and its saponin fraction in Streptozotocin-induced Diabetes in Rats. *Journal of Young Pharmacists*. 4:171-176.
- Saxne T, Palladino MA, Heinegård JD, Talal N and Wollheim FA.** (1988). Detection of tumor necrosis factor α but not tumor necrosis factor β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis and Rheumatology*. 31:1041-1045.
- Scott DL, Wolfe F and Huizinga TW.** (2010). Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 376:1094-1108.
- Seo HH and Jeong JM.** (2014). Inhibitory effects of complex of Mulberry extract on degenerative arthritis. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:262-269.
- Serag El-Dien MM, Abdou AG, Asaad NY, Abd El-Wahed MM and Kora MAE-HM.** (2016). Intratumoral FOXP3+ regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 25:534-542.
- Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M and Nagai Y.** (1993). The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors(TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 94: 145-149.
- Song HP, Li X, Yu R, Zeng G, Yuan Z, Wang W, Huang H and Cai X.** (2015). Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in wistar rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 10:1483-1488.
- Srirangan S and Choy EH.** (2010). The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2:247-256.
- Sun J, Jia Y, Li R, Guo J, Sun X, Liu Y, Li Y, Yao H, Liu X, Zhao J and Li Z.** (2011). Altered influenza virus haemagglutinin

- (HA)-derived peptide is potent therapy for CIA by inducing Th1 to Th2 shift. *Cell and Molecular Immunology*. 8:348-358.
- Symmons DPM.** (2002). Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 16:707-722.
- Tanaka T, Narazaki M and Kishimoto T.** (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10:a016295. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/6/10/a016295> (cited by 2020 Aug 10).
- Watcho P, Zelefact F, Nguelack TB, Ngouela S, Telefo PB, Kamtchouing P, Tsamo E and Kamanyi A.** (2006). Effects of the aqueous and hexane extracts of *Mondia whitei* on the sexual behaviour and some fertility parameters of sexually inexperienced male rats. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*. 4:37-46.
- Whittle SL and Hughes RA.** (2004). Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: A review. *Rheumatology*. 43:267-271.
- Williams RO.** (2004). Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods in Molecular Medicine*. 98:207-216.
- Yin H, Cho B, Fang C, Shim JS and Jang SI.** (2015). Anti-obesity effects of water extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine*. 29:322-329.