



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 8월  
석사학위논문

흰쥐 연골세포에서  
*Campylocephora hypnaeoides*  
추출물의 연골보호 효과

조선대학교 대학원

치의생명공학과

장 지 연

흰쥐 연골세포에서  
*Campylaephora hypnaeoides*  
추출물의 연골보호 효과

Chondroprotective Effect of *Campylaephora*  
*hypnaeoides* Extract in Rat Chondrocytes

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

장 지 연

흰쥐 연골세포에서  
*Campylocephora hypnaeoides*  
추출물의 연골보호 효과

지도교수 김 춘 성

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

장 지 연

## 장지연의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교 수    김 흥 중



위 원    조선대학교    교 수    김 도 경



위 원    조선대학교    교 수    김 춘 성



2023년 5월

조선대학교 대학원

## 목차

LIST OF FIGURES .....	iii
LIST OF ABBREVIATIONS .....	iv
ABSTRACT .....	vi
제 1 절 서론 .....	1
제 2 절 재료 및 방법 .....	3
2.1. 실험 재료 .....	3
2.1.1. 석묵 추출물 제조 .....	3
2.1.2. 시약 .....	3
2.2. 실험 방법 .....	3
2.2.1. 흰쥐 연골세포 분리 및 배양 .....	3
2.2.2. 면역세포화학법 .....	4
2.2.3. 세포생존률 분석 .....	4
2.2.4. 질산염, PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ 측정 .....	5
2.2.5. 단백질면역발색법 .....	5
2.2.6. Alcian blue 염색 .....	6
2.2.7. 흰쥐 내측 반월판 손상 골관절염 질환 실험동물 모델 제작 .....	6
2.2.8. 조직학적 분석 .....	6
2.2.9. 실험자료의 통계학적 검정 .....	7

<b>제 3 절 결과</b> .....	<b>8</b>
3.1. 석묵 추출물의 초대배양 연골세포 생존률에 미치는 영향 .....	8
3.2. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 nitric oxide, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 PGE <sub>2</sub> 발현에 대한 석묵 추출물의 억제효과 ...	10
3.3. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 ADAMTS-5, ADAMTS-4, MMP-1, MMP-3, MMP-13 발현에 대한 석묵 추출물의 억제효과 .....	12
3.4. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 collagen type II와 proteoglycan 분해에 대한 석묵 추출물의 보호효과 .....	14
3.5. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 NF- $\kappa$ B p65 핵 전이 및 MAPKs 인산화 억제를 통한 석묵 추출물의 연골보호 기전 .....	16
3.6. 골관절염 질환 실험동물에서 석묵 추출물의 연골보호효과 .....	18
 <b>제 4 절 고찰</b> .....	 <b>20</b>
 <b>제 5 절 결과</b> .....	 <b>22</b>
참고문헌 .....	23
감사의 글 .....	27

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Effects of fermentation ethanol of <i>campylaephora hypnaeoides</i> (FeCH) on primary rat chondrocytes viability .....	35
Figure 2. Inhibitory effects on FeCH on IL-1 $\beta$ -induced nitrite, PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ and COX-2 in primary rat chondrocytes .....	36
Figure 3. Inhibitory effects on FeCH on IL-1 $\beta$ induced ADAMTS-5, -4 and MMP-1, -3, -13 in primary rat chondrocytes .....	37
Figure 4. Effect of FeCH on collagen type II and proteoglycan in IL-1 $\beta$ -stimulated primary rat chondrocytes .....	38
Figure 5. Effect of FeCH on phosphorylation of MAPKs and activation of NF- $\kappa$ B in IL-1 $\beta$ -stimulated primary rat chondrocytes .....	39
Figure 6. Histological evaluation of cartilage-protective effect of FeCH against cartilage degradation in a DMM model .....	40



## LIST OF ABBREVIATIONS

ADAMTS	.....	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
$\alpha$ -tubulin	.....	alpha-tubulin
BSA	.....	Bovine serum albumin
COI II	.....	Collagen type II
COX-1	.....	Cyclooxygenase-1
COX-2	.....	Cyclooxygenase-2
DAPI	.....	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM/F-12	.....	Dulbecco's modified eagls's medium/Nutrlent Mixture F-12
DMM	.....	Destabilization of the medial meniscus
DMSO	.....	Dimethyl sulfoxide
ECL	.....	Enhanced chemiluminescence
ELISA	.....	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	.....	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	.....	Fetal bovine serum
FeCH	.....	<i>campylaephora hypnaeoides</i> Fermentation ethanol extract
HRP	.....	Horseradish peroxidase
ICC	.....	Immunocytochemistry
iNOS	.....	Inducible nitric oxide synthase
IL-1 $\beta$	.....	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	.....	Interleukin-6
JNK	.....	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	.....	Mitogen-activated protein kinase
MMPs	.....	Matrix metalloproteinases
MTT	.....	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	.....	Nuclear factor- $\kappa$ B
OA	.....	Osteoarthritis

PBS	Phosphate buffered saline
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
p-ERK	phosphorylation-Extracellular signal-regulated kinase
p-JNK	phosphorylation-c-Jun N-terminal kinase
PVDF	Polyvinylidene fluoride
SD Rat	Sprague-Dawley rats
SDS-PAGE	Sodium dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	Tris buffered saline with tween 20
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha

## ABSTRACT

### Chondroprotective Effect of *Campylaephora hypnaeoides* Extract in Rat Chondrocytes.

Jang, Jiyun

Advisor : Prof. Kim, Chun Sung, Ph.D.

Department of Biodental Engineering

Graduate school of Chosun University

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease in people over the age of 65 and is characterized by gradual and irreversible cartilage wear, synovial inflammation, and subchondral bone remodeling. Since OA has no early symptoms and articular cartilage is a tissue with limited self-healing, it is very important to manage and maintain it healthy. Since OA has no early symptoms and is a tissue with limited self-healing, it is very important to manage and maintain it healthy. In order to maintain healthy joints, the intake of joint health functional foods is increasing, but glucosamine and MSM, which account for 80% of the raw materials of joint health functional foods, are raising concerns about efficacy. Therefore, this study aims to develop materials that are safe and have significant efficacy and provide scientific basis for joint health.

*Campylaephora hypnaeoides* (Egonori, *C. hypnaeoides*) is an edible seaweed belonging to the red algae, and is distributed along the coasts of Korea and Japan. *C. hypnaeoides* is rich in polysaccharides, and has been consumed after being boiled since ancient times. Recently, it has been reported that *C. hypnaeoides* ethanol extract reduced body fat and alleviates metabolic disorders through anti-inflammatory and anti-oxidant activity. However, no other functionalities have been reported. Therefore, in this study, the chondroprotective

effect and its mechanism of *C. hypnaoides* fermented ethanol extract (FeCH) were analyzed using primary chondrocytes and osteoarthritis-induced experimental animals.

*C. hypnaoides* was extracted using 30% fermented ethanol. The effect of FeCH on chondrocyte viability was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, which showed no cytotoxicity at 2 mg/ml. Pretreatment with FeCH in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes significantly inhibited the accumulation of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which was analyzed using the ELISA assay. In addition, protein expression levels of inflammatory-related factors, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and cartilage degrading-related enzymes, such as metalloproteinases (MMP)-1, -3, -13 and A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4, -5, were significantly decreased in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes pretreated with FeCH, were analyzed using western blot analysis. In addition, as a result of analyzing the content of type II collagen and proteoglycan through western blot analysis and alcian blue staining, FeCH pretreatment prevented the degradation of collagen type II and proteoglycan. It was analyzed through western blot analysis that the chondroprotective effect of FeCH may be mediated through MAPK and NF- $\kappa$ B signaling mechanisms. In an *in vivo* study, a rat model with damaged medial meniscus (DMM) was used as an osteoarthritis experimental animal model and orally administered daily for 8 weeks after surgery. At the end point, knee joints were collected and histologically analyzed with safranin O staining. As a result, articular cartilage was significantly protected in the FeCH group compared to the DMM group, without a change in body weight.

These results suggested that *C. hypnaeoides* as a candidate material for the development of food and pharmaceutical materials for the treatment or prevention of degenerative arthritis.

## 제 1 절 서론

골관절염(Osteoarthritis, OA)은 노인 퇴행성질환 중 가장 대표적인 질환으로, 비만, 외상 등 다양한 요인에 의해 점진적으로 연골이 마모되어 유발된다[1,2]. 특히, 골관절염의 초기 단계에서는 충격 흡수기능을 하는 연골기질(Extracellular matrix, ECM)의 구조와 구성 성분의 변화가 유발되며, 이를 회복하기 위해 연골 세포 증식과 ECM 합성이 빠르게 증가한다. 궁극적으로 이러한 변화는 연골 세포를 자극하여 연골 분해와 관련된 이화인자를 생성하여 연골 세포사멸 및 관절 연골 손실을 초래한다[1,3].

IL-1 $\beta$ 는 ECM을 분해하고 염증을 유발하는 다양한 인자들을 활성화시키기 때문에 골관절염을 유도하기 위해 *in vitro* 모델에서 주로 사용하고 있다[4, 5,6]. IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 iNOS 및 PGE<sub>2</sub>는 골관절염의 진행 과정에서 각종 염증성 사이토카인의 발현을 유도하여 ECM의 항상성을 무너뜨림으로써 연골세포 사멸 및 연골기질 분해를 촉진하는 요소이다[3,7,8]. 또, 관절 연골 ECM의 주요 구성 요소인 col II와 proteoglycan은 MMPs와 ADAMTS과 같은 이화효소에 의해 분해되며[9,10], 이러한 효소는 IL-1 $\beta$  혹은 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 사이토카인의 영향으로 활성화된다. 따라서 OA 발병 기전에서 IL-1 $\beta$ , MMPs, ADAMTSs의 발현 억제는 관절 개선 소재 개발에서 중요한 지표로 간주되고 있다[11,12].

MAPKs와 NF- $\kappa$ B는 세포 성장, 분화, 사멸 등 다양한 세포 생리활성에 관여하는 대표적인 신호 전달체계로 알려져 있다[13]. 또, 이들의 신호전달은 연골세포의 사멸과 연골기질 분해를 유발하는 중요한 기전이다. IL-1 $\beta$ 에 의해 MAPKs는 인산화되어 다른 신호전달체계를 활성화하거나 이화효소들의 발현을 촉진시키며, NF- $\kappa$ B p65 subunit는 전사인자로서 인산화되어 핵으로 이동하여 이화효소들의 발현을 유도한다[14,15,16,17]. 따라서, IL-1 $\beta$ 에 의해 염증이 유발된 연골세포에서 이러한 신호전달체계의 활성을 억제하는 것은 궁극적으로 연골기질을 분해하는 다양한 인자의 발현을 억제하는 것으로 골관절염 개선에서 매우 중요한 기전이다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고 현재까지 골관절염을 치료하는 뚜렷한 치료약은 없다.

현재 OA 치료 중 약물로는 염증을 억제하는 NSAID를 복용하거나 수술로는 인공관절, 미세천공술과 같은 시술이 있으나, 높은 비용, 한정된 수명, 줄기세포의 잘못된 분화 등의 부작용이 뒤따른다[18]. 따라서 골관절염은 치료보다 예방이 더 중요하다고 인식되며[19,20], 상대적으로 저렴하고 안전한 천연물을 사용하여 골관절염 초기에 골관절염의 진행을 억제하는 것이 주목받고 있다[3,20,21]. Henrotin Y 등(2013)은 골관절염을 더 안전하게 보완할 수 있는 치료 물질로 천연물의 가능성 높이 평가하였다[22].

석묵(*Campylophora hypnaeoides*)은 비단풀과에 속하는 홍조류로 한국, 일본 연안에 분포하고 있으며, 오랫동안 음식의 재료로 사용되어져 왔다[23]. 그러나 산화 스트레스와 염증 억제를 통한 대사 장애 완화에 대한 연구 외에 석묵의 기능에 대한 과학적 연구는 전무한 실정이다[24]. 따라서, 본 연구의 목적은 석묵의 연골 보호 효과 및 그 기전을 분석하여 골관절염의 치료 및 예방을 위한 제품 개발의 유용한 소재로 그 가능성을 제시하고자 한다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 2.1. 실험 재료

#### 2.1.1. 석목 추출물 준비

전라남도 완도에서 채취한 석목(*Campylocephora hypnaeoides*)을 2회 세척 후, 60도에서 24시간 건조하였다. 이후 30% 발효 주정으로 추출하여 농축, 동결건조하여 4℃에서 보관하였다. 본 실험에서는 동결 건조된 석목 추출물을 complete DMEM/f-12 배지에 2mg/ml의 농도로 용해하여 사용하였다.

#### 2.1.2. 시약

Live/Dead™ Viability/Cytotoxicity kit는 Thermo Scientific(Waltham, Ma, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 4' 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체 iNOS(#15323), COX-2(#179800), TNF- $\alpha$ (#66579), IL-6(#229381), ADAMTS-5(#182795), -4(#185722), MMP13(#39012), Abcam(Cambridge, UK), COX-1(#4841S), MMP-3(#143515), p-ERK(#9101S), ERK(#9102S), p-JNK(#4668S), JNK(#9252S), p-p38(#4631S), p38(#9212S)은 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 MMP-1(#352518)은 LSBio(Seattle, WA, USA),  $\alpha$ -tubulin(#32-2500), collagen type II(#12789), p65(#16545)는 Invitrogen(Waltham, MA, USA), Lamin B1(#56144)은 santacruz(Dallas, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 실험 방법

#### 2.2.1. 흰쥐 연골세포 분리 및 배양

동물실험은 조선대학교 Institutional Animal Care and Use Committee의 심의 및 승인(CIACUC2022-A0019) 후 수행하였다. 5일령 SD 흰쥐로부터 연골 조직을 분리한 후 0.15% collagenase II를 15시간 처리하여 연골세포를 획득하였다. 분리한 연골세포는 10% fetal bovine serum(FBS; iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)과 항생제(100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12(DMEM/F12; Welgene, Gyeonsan, Korea)를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다.

### 2.2.2. 면역세포화학법

분리한 세포가 연골세포가 맞는지 확인하기 위해 면역세포화학법을 수행하였다. 4-well chamber slide에  $4 \times 10^5$ 개 cell/ml 비율로 연골세포를 분주한 후, 3일간 배양하였다. 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하고 PBS로 세척 후, 0.1% Triton X-100을 첨가하여 5분간 동안 고정하였다. 1% BSA로 30분 동안 blocking한 후, 1차 항체인 collagen type II를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응하였다. PBS로 세척 후, 빛을 차단한 뒤 2차 항체를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응하였다. DAPI 용액을 첨가하고 5분간 염색한 뒤, 형광 현미경(Eclipse TE2000; Nikon-Instruments, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하였다.

### 2.2.3. 세포생존률 분석

석묵 추출물에 대한 연골세포의 생존율을 MTT 기법을 이용하여 분석하였다. 12-well culture plate에  $1.5 \times 10^6$ 개 cell/ml의 연골세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 0.25, 0.5, 1, 2mg/ml 추출물을 처리하여 24시간 추가 반응한 후, complete DMEM/F-12(c/DMEM/F-12) 배양액 1ml당 MTT(5 mg/ml) 용액 100 $\mu$ l를 첨가하고 37°C, 5.6% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배양액을 제거하고 formazan salt를 DMSO로 녹인 후 ELISA reader(Epoc-



h; BioTek instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 590nm 흡광도에서 세포 생존율을 측정하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하고, 추출물을 처리한 실험군의 흡광도를 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었으며, 그 계산식은 다음과 같다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Means\ Abs.\ of\ the\ sample - Means\ Abs.\ of\ the\ blank}{Means\ Abs.\ of\ the\ control - Means\ Abs.\ of\ the\ blank} \times 100$$

#### 2.2.4. 질산염, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ 측정

12-well culture plate에  $1.5 \times 10^6$ 개 cell/ml의 연골세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 0.25, 0.5, 1, 2mg/ml 추출물을 1시간 전처리하고 IL-1 $\beta$  (5 ng/ml)를 처리하여 24시간 반응하였다. 세포 밖으로 분비되어 배지에 축적된 질산염, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

#### 2.2.5. 단백질면역발색법

12-well culture plate에  $1.5 \times 10^6$ 개 cell/ml의 연골세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 0.25, 0.5, 1, 2mg/ml 추출물을 1시간 전처리하고 IL-1 $\beta$  (5 ng/ml)를 처리하여 24시간 반응하였다. 총 단백질은 PRO-PREP 단백질 추출 용액(iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 획득하였다. 분리된 단백질의 농도는 albumin(2 mg/ml, ThermoScientific, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 단백질(15  $\mu$ g)을 8% 또는 10% SDS-PAGE를 사용하여 분리한 다음 polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 옮겼다. Transblotting 된 membrane을 0.1% Tween 20(TBST)을 함유하는 5% Bovine serum albumin(BSA)에 넣어 50분 동안 반응한 후, membrane을 특이 1차 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응한 뒤, TBST로 10분마다 세 번 세척하였다. 세척 후, membrane을 2차 항체와 함께 실온에서 50분 동안 반응하였으며, 단백질발현 검출에는 enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Mill

lipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 이미지 판독기(Ras-4000, Fujifilm, Tokyo, Japan)로 시각화하였다.

### 2.2.6. Alcian blue 염색

6-well culture plate에  $2 \times 10^5$ 개 cell/ml의 연골세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 0.25, 0.5, 1, 2mg/ml 추출물을 1시간 전처리하고 IL-1 $\beta$  (5 ng/ml)를 처리하여 24시간 반응하였다. 연골세포는 실온에서 1시간 동안 70% EtOH로 고정한 후, PBS로 세척한 다음 1% alcian Blue 용액으로 2시간 동안 염색한 후 증류수로 가볍게 세척한 뒤 이미지를 촬영하였다. 촬영 후 6 M guanidine-HCl로 녹여 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.2.7. 흰쥐 내측 반월판 손상 골관절염 질환 실험 동물 모델 제작

6주령 수컷 SD 흰쥐는 다물사이언스(대전, 대한민국)로부터 공급받았다. 실험동물은  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  온도 및  $55 \pm 5\%$  습도 조건에서 사육하였으며, 물과 사료를 자유롭게 식이하도록 하였다. 모든 실험동물은 일주일간의 순치기간 후 실험에 이용되었다. 인간 골관절염과 유사한 병인을 유도하기 위해 동물 모델 무릎에 일반적으로 사용되는 내측 반월상 연골 불안정화(DMM) 수술을 시행하였다. 수술 전 이소플로란으로 흡입마취를 하였으며, 실험동물의 양 무릎관절의 내측 반월판을 blade를 이용하여 손상을 가하였다. 이후 근육, 피부 순으로 봉합한 뒤 소독하였다. 수술 후, 다음날부터 8주간 매일 석묵 추출물을 경구투여하였다; 그룹 1(대조군), 그룹 2(DMM), 그룹 3,4(DMM, 각각 25, 50mg/kg, 석묵 추출물), 그룹5(celecoxib). 경구투여 종료 다음날 모든 실험동물을 희생한 뒤 무릎 조직을 채취하였다.

### 2.2.8. 조직학적 분석

무릎 관절 샘플은 10% neutral buffered formalin(NBF)를 넣어 하루 동안 고정한 뒤, 4주 동안 0.5 M EDTA(pH7.4)에 넣어 칼슘을 제거하였다. 이후,

차례로 70, 80, 90, 100% 에탄올 용액에 넣어 탈수작업을 한 뒤 100% xylene 을 넣어 에탄올을 제거하였다. 작업이 끝난 샘플은 파라핀 블록에 포매하였다. 그 후 8 $\mu$ m 간격으로 절편하여 slide warmer에 24시간동안 건조시켰다. 이후, safranin-O와 fastgreen으로 염색하였고, 0A 심각도는 국제 골관절염 연구 학회(OARSI) 점수를 기준으로 블라인드 평가하였다.

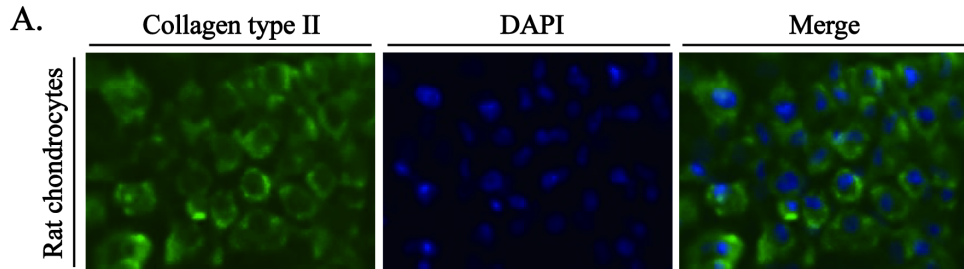
### 2.2.9. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험은 독립적인 3건의 반복 실험을 통해 얻었으며, 결과는 표준편차 값으로 나타내었다. 각 실험군간의 유의성 검정은 GraphPadPrism 5.0 software의 Dunnett test, analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 유의성 검증을 하였으며, p-value가 0.05 미만의 경우에 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

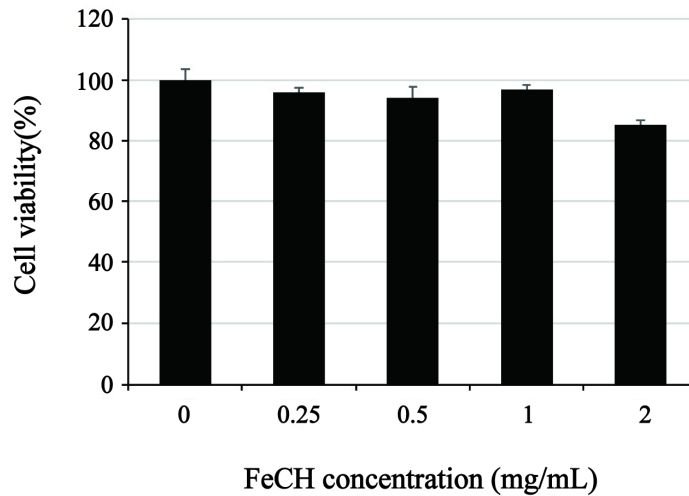
## 제 3 절 결과

### 3.1. 석묵 추출물의 초대배양 연골세포의 생존률에 미치는 영향

분리한 세포가 연골세포인지 확인하기 위해 collagen type II를 이용하여 면역세포화학기법을 수행하였다. 그 결과, 녹색의 collagen type II는 세포질에 분포하고 있는 것으로 나타났다. Collagen type II는 연골세포 기질의 구성 성분으로 세포질에 분포하고 있으므로, 이러한 결과는 분리한 세포가 연골세포임을 시사한다(Fig. 1A). 연골세포 생존률에 미치는 추출물의 영향을 분석하기 위해 MTT 기법을 수행하였다. 석묵 추출물을 2mg/ml까지 처리한 결과, 세포 생존률에는 영향을 미치지 않았다. 이후 실험은 0.125, 0.25 및 0.5mg/ml의 농도로 추출물을 처리하였다(Fig. 1B).



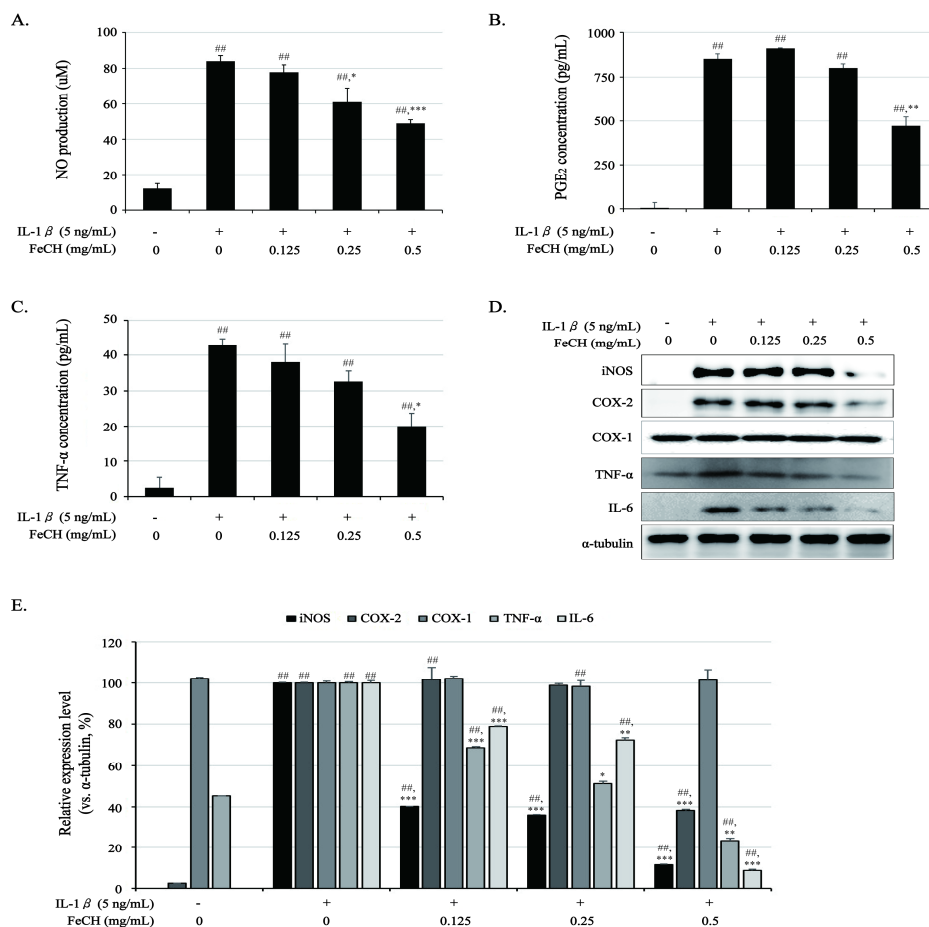
B.



**Figure 1. Effects of fermentation ethanol of *Campylaephora hypnaeoides*(FeCH) on primary rat chondrocytes viability.** (A) Immunocytochemistry (ICC) staining of chondrocytes using collagen type II antibody after 3 days of culture. (B) primary rat chondrocytes were treated with FeCH (0.25, 0.5, 1 and 2 mg/mL) for 24 h, and viability was determined by MTT assay. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### 3.2. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 NO, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub> 발현에 대한 석묵 추출물의 억제효과

NO, iNOS, PGE<sub>2</sub>, COX-2와 같은 전염증성 사이토카인의 발현으로 인한 염증은 골관절염 발병의 주요 요인 중 하나이다[3,7]. 따라서, 석묵 추출물이 항염증 효과가 있는지 평가하기 위해, 연골세포에 석묵 추출물을 전처리하여 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 NO, PGE<sub>2</sub>, COX-2 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 매개체의 발현을 분석하였다. IL-1 $\beta$ 로 자극된 연골세포는 자극되지 않은 연골세포에 비해 NO, iNOS, PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$ 의 분비가 증가하였으며, 단백질 발현 역시 유의하게 증가하였다(Fig. 2A-E). 반면, 추출물을 전처리한 연골세포에서는 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 NO, iNOS, PGE<sub>2</sub>, COX-2, TNF- $\alpha$  및 IL-6의 발현을 농도-의존적으로 억제하였다(Fig. 2A-E). 또, 위장 점막 보호 효소와 관련 있는 COX-1은 염증 유발 여부와 상관없이 일정하게 나타났다(Fig. 2D). 이러한 결과는 석묵 추출물이 항염증 효과가 있음을 시사한다.

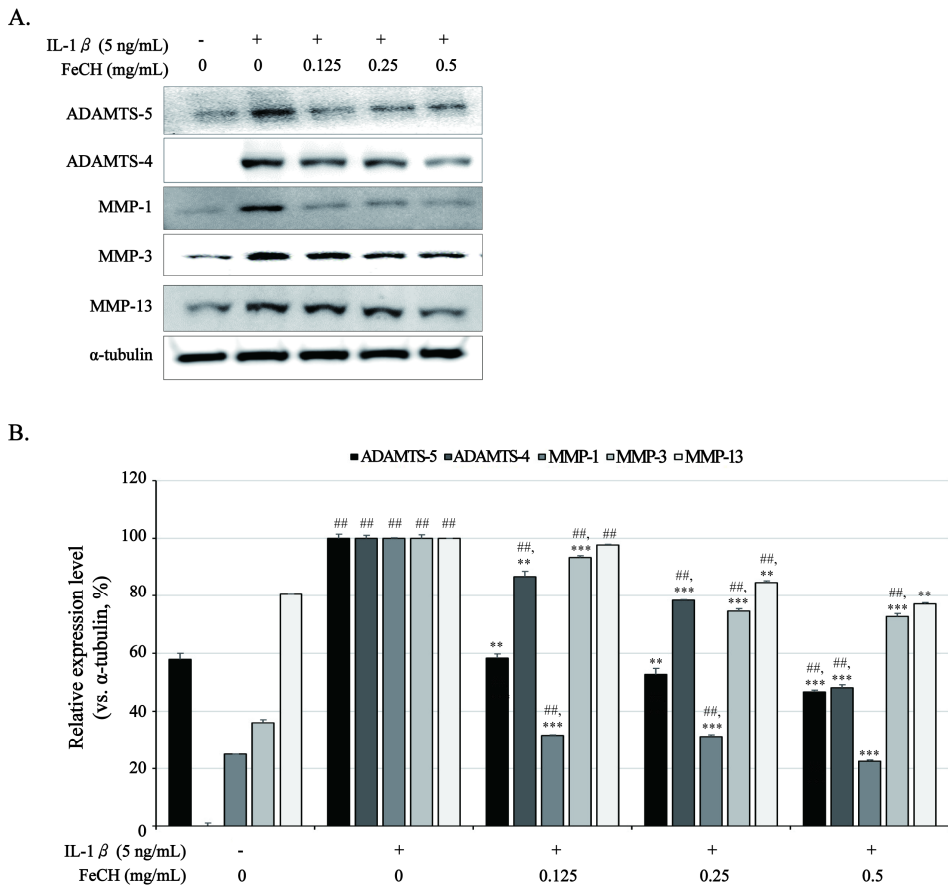


**Figure 2. Inhibitory effects of FeCH on IL-1 β-induced nitrite, PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6 and COX-2 in primary rat chondrocytes.** Primary rat chondrocytes were pretreated with FeCH (0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL) for 1 h, followed by IL-1 β (5 ng/mL) for 24 h. Nitrite production (A), PGE<sub>2</sub> production (B), TNF-α production (C) in the medium was determined by ELISA kit. (D) Expression of iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6 and COX-1 expression was determined by western blot. (E) Quantitative data of (D) were analyzed using Image J software. Data are represented as mean ± SD of three independent experiments. α-tubulin served as an internal control. <sup>##</sup>*p*<0.01 vs. control; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, and \*\*\**p*<0.001 vs. IL-1 β treated group.

### 3.3. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 ADAMTS-5, ADAMTS-4, MMP-1, MMP-3, MMP-13 발현에 대한 석묵 추출물의 억제효과

연골기질을 분해하는 효소의 활성화에 대한 석묵 추출물의 효과를 평가하기 위해, ADAMTSs와 MMPs의 발현을 분석하였다. IL-1 $\beta$ 에 의해 ADAMTS-5, -4, MMP-1, -3, -13의 발현이 현저히 증가하였으나, 석묵 추출물의 전처리에 의해 이들의 활성이 점차 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3A and B) 이러한 결과는 석묵 추출물이 연골기질을 분해하는 효소들의 활성을 억제함으로써 연골 보호 효과의 가능성을 시사한다(Fig. 3A and B).

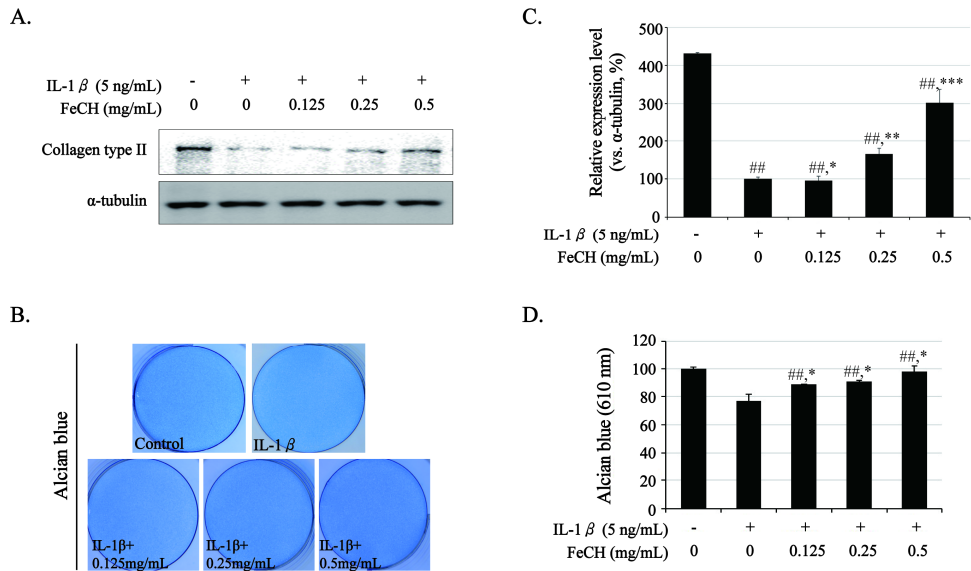




**Figure 3. Inhibitory effects of FeCH on IL-1  $\beta$  induced ADAMTS-5, -4 and MMP-1, -3, -13 in primary rat chondrocytes.** Primary rat chondrocytes were pretreated with FeCH (0.125, 0.25 and 0.5 mg/mL) for 1 h, followed by IL-1  $\beta$  (5 ng/mL) for 24 h. (A) Protein levels of matrix degrading enzymes (ADAMTS-5, -4 and MMP-1, -3, -13) was determined by western blot. (B) Quantitative data of (A) were analyzed using Image J software. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $\alpha$ -tubulin served as an internal control.  $##p < 0.01$  vs. control;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$  vs. IL-1  $\beta$  treated group.

### 3.4. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 collagen type II와 proteoglycan 분해에 대한 석묵 추출물의 보호효과

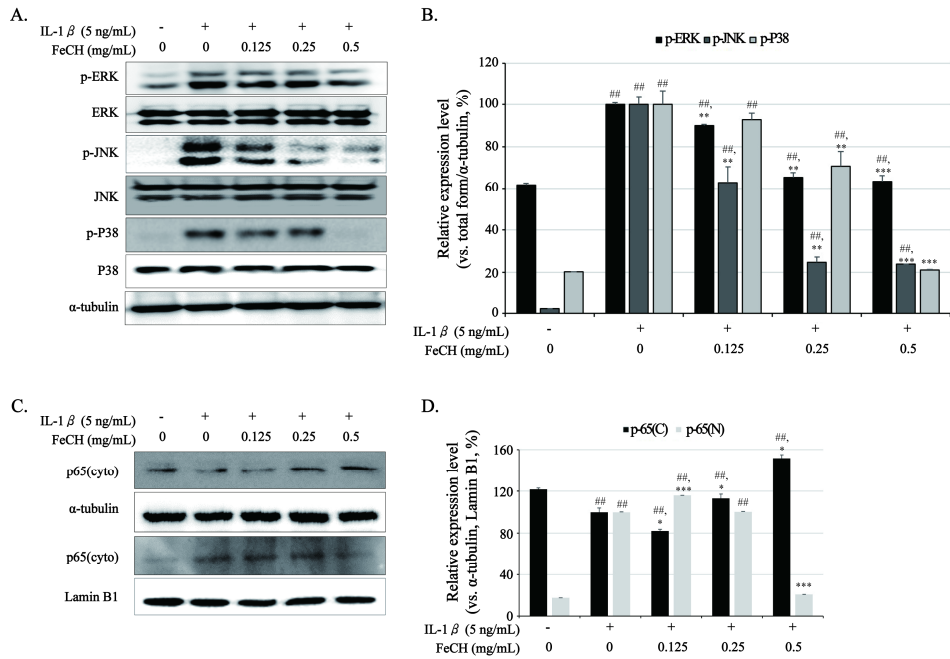
ECM 성분인 col II와 proteoglycan은 정상 연골에 풍부하게 존재하며 연골이 손상될수록 함량이 감소한다. 전처리된 추출물이 col II 분해를 억제함을 확인하기 위해 Western blot을 통해 확인하였다. 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 염증이 유발되었을 때 col II의 농도는 감소하였으나, 추출물이 전처리된 연골세포에서는 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4 and B). 또한, 전처리된 추출물이 proteoglycan의 분해를 억제함을 확인하기 위해 alcian blue stain을 통해 측정한 결과, IL-1 $\beta$ 에 의해 염증이 유발되었을 때 proteoglycan의 농도는 감소한 반면, 석묵 추출물이 처리된 연골세포에서는 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4C and D).



**Figure 4. Effect of FeCH on collagen type II and proteoglycan in IL-1  $\beta$  -stimulated primary rat chondrocytes.** Primary rat chondrocytes were pretreated with FeCH (0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL) for 1 h, followed by IL-1  $\beta$  (5 ng/mL) for 24 h. (A) Protein levels of collagen type II degradation was determined by western blot. (B) Quantitative data of (A) were analyzed using Image J software. (C) proteoglycan degradation was determined by alcian blue stain. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $\alpha$ -tubulin served as an internal control. <sup>##</sup> $p$ <0.01 vs. control; <sup>\*</sup> $p$ <0.05, <sup>\*\*</sup> $p$ <0.01, and <sup>\*\*\*</sup> $p$ <0.001 vs. IL-1  $\beta$  treated group.

### 3.5. 흰쥐 초대배양 연골세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 NF- $\kappa$ B p65의 핵 전이 및 MAPKs 인산화 억제를 통한 석묵 추출물의 연골보호 효과 기전

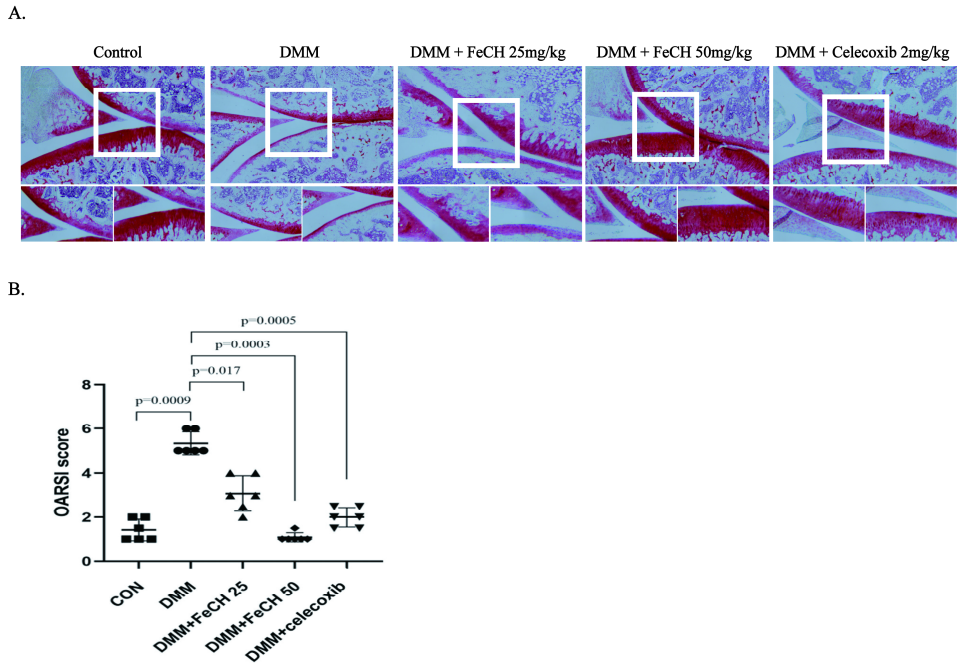
추출물의 처리에 따른 염증 신호전달 경로 마커인 MAPKs의 인산화와 MMP의 전사를 조절하는 NF- $\kappa$ B p65 subunit의 전사 여부를 Western blot을 통해 확인하였다. IL-1 $\beta$ 로 자극된 연골세포는 ERK, JNK 및 p38을 포함한 MAPKs의 인산화를 활성화시켰으나, 추출물 전처리된 연골세포에서는 ERK, JNK, p38의 인산화가 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5A and B). IL-1 $\beta$ 에 의해 염증이 생긴 연골세포에서는 NF- $\kappa$ B p65의 인산화가 일어나고, 핵으로 이동되었다(Fig. 5C and D). 반면, 추출물이 전처리된 연골세포는 농도 의존적으로 NF- $\kappa$ B p65의 인산화를 억제하여 핵으로의 이동이 일어나지 않았다(Fig. 5C and D). 이러한 결과는 흰쥐의 연골 세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 연골 분해 효소의 발현이 MAPKs와 NF- $\kappa$ B의 신호 전달을 통해 매개되었으며, 추출물이 ECM 분해를 유도하는 신호 경로를 억제함을 시사한다.



**Figure 5. Effect of FeCH on phosphorylation of MAPKs and activation of NF- $\kappa$ B in IL-1  $\beta$ -stimulated primary rat chondrocytes.** Primary rat chondrocytes were pretreated with FeCH (0.125, 0.25 and 0.5 mg/mL) for 1 h, followed by IL-1  $\beta$  (5 ng/mL) for 24 h. (A) Protein levels of phosphorylation of MAPKs was determined by western blot. (B) Quantitative data of (A) were analyzed using Image J software. (C) phosphorylation levels of NF- $\kappa$ B p65 determined by western blot. (D) Quantitative data of (C) were analyzed using Image J software. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $\alpha$ -tubulin, Lamin B1 served as an internal control. ### $p$ <0.01 vs. control; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, and \*\*\* $p$ <0.001 vs. IL-1  $\beta$  treated group.

### 3.6. 골관절염 질환 실험동물에서 석묵 추출물의 연골보호 효과

DMM 유발 OA model에서 추출물의 연골보호 효과를 조사하기 위해 Safranin-O/Fast green 염색 및 OARSI 점수를 사용하여 관절 연골의 구조적 무결성을 평가하였다. 그룹 2(DMM)는 대조군에 비해 심한 골관절염이 발생하여 관절 연골에서 proteoglycan의 감소와 연골 표면의 손상이 일어나는 등의 연골 결손이 관찰되었으며, OARSI 점수 역시  $5.5 \pm 0.5$ 로 평가되었다(Fig. 6A, 6B). 그러나 25, 50 mg/kg 추출물이 처리된 OA 그룹은 관절 연골에서 proteoglycan 손실이 적고 연골 파괴가 적어 연골 결손이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 또한, 블라인드 테스트에서 낮은 OARSI 점수(각각  $3 \pm 1$ ,  $1.25 \pm 0.25$ )로 평가되었다(Fig. 6B). 이러한 결과는 추출물의 처리가 흰쥐 OA 모델에서 OA 진행을 억제하였음을 시사한다.



**Figure 6. Histological evaluation of cartilage-protective effect of FeCH against cartilage degradation in a DMM model.** (A) *In vivo* schematic. (B) Rat underwent surgical destabilization of the medial meniscus (DMM). The day after the DMM surgery, rats were orally administered with FeCH (25 and 50 mg/kg) or celecoxib (2 mg/kg) daily for 8 weeks. Histological analysis of cartilage destruction was evaluated by safranin O/fast green staining.

## 제 4 절 고찰

골관절염은 주로 65세 이상에서 흔히 발생하며, 관절 연골의 마모로 인해 통증과 움직임에 불편함을 유발하여 건강한 노화를 방해하는 대표적인 질환이다[1]. 기존에는 관절의 만성 과부하 및 손상으로 인해 관절 연골 파괴와 염증이 발생한다고 생각하였으나, 현재 골관절염은 염증 및 대사 요인을 포함한 더욱 복잡하고 다양한 과정이라 보고되고 있다[25]. 퇴화된 연골은 윤활막 세포 내에서 이물질 반응을 유도하여 염증성 사이토카인 생성 및 MMPs, NF- $\kappa$ B 신호를 통해 염증을 유발하고 연골을 파괴한다[3,26,27]. 골관절염은 통증과 삶의 질 감소 및 높은 의료비용이 수반되는 질환으로 현재 치료법은 관절 완화와 통증 관리에 국한되며, 연골 및 위장관이 보호되지 않는 등의 부작용이 있다[28,29]. 또한, 진단 당시 연골 파괴가 상당히 진행된 경우가 많아 완전한 관절염 치료가 어려워 예방이 중요하게 여겨진다[30,31]. 최근에는 골관절염 예방이 가능하고 상대적으로 저렴하며 안전하게 관절 건강을 증진시키는 천연물 소재를 식별하는데 관심이 커지고 있다[19,22].

석목은 한국과 일본의 해안에 분포하며, 예로부터 삶아서 굳힌 형태로 섭취되어온 해조류이다. Murakami S 등(2022)은 석목 에탄올 추출물이 항염증 및 항산화 작용을 통해 대사장애를 완화시킨다고 보고하였다[24]. 이에 본 연구에서는 석목 발효주정 추출물을 사용하여 연골세포에서 MAPKs, NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 통한 연골보호 효과를 조사했으며, 그 효과를 DMM OA model에서 입증하였다.

본 연구에서 사용된 추출물과 유사한 효과는 다양한 천연물의 관절염 방지 및 연골보호 효과에 대한 이전 연구에서 관찰되었다. Mével E 등(2016)은 올리브 및 포도씨 추출물이 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 NO, PGE<sub>2</sub> 및 MMP-13 발현을 억제하여 외상 후 골관절염 손상을 예방한다고 보고하였으며[32], Nazir M 등(2017)은 wogonin(5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone)이 염증 매개체(nitrite oxide, PGE<sub>2</sub>, COX-2 및 iNOS) 및 ECM 단백질분해효소(MMP-3, MMP-13 및 ADAMTS-4) 발현을 억제하여 연골보호 효과를 가진다고 보고하였다[33]. 또한, Han SJ 등(2021)은 safflower seed 추출물이 NF- $\kappa$ B 신호경로를 차단하여 MMPs,



ADAMTS 등 이화인자의 발현을 억제하여 골관절염을 악화시킨다고 보고하였으며[34], Nam DE 등(2014)은 보스웰리아 추출물이 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여, NF- $\kappa$ B와 TNF- $\alpha$ 가 서로 재활성화 시키는 양성피드백을 억제한다고 보고하였다[35].

본 연구에서는 IL-1 $\beta$ 에 의해 염증이 유도된 연골세포에 석묵 추출물을 처리하였을 때, iNOS, PGE<sub>2</sub>, ADAMTS-4, -5 및 MMP-1, -3, -13의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, MAPKs(ERK1/2, JNK 및 p38)의 인산화와 NF- $\kappa$ B p65 subunit의 핵이동 억제를 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과를 통해 석묵 추출물이 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 의해 ECM을 분해하는 이화효소의 활성을 억제하여 연골 보호 효능을 가지는 것으로 사료된다.

DMM 유도 OA 모델은 내측 반월판 손상을 통해 연골의 불안정화를 유도하여 관절 연골의 손실이 진행된다. 이는 부상 및 노화 관련 골관절염과 유사하여 골관절염 동물모델로 많이 사용된다[36]. Lee H 등(2020)은 서마쑥 추출물을 경구투여한 DMM 유도 OA model의 조직절편을 safranin-O 염색하여 연골 두께 및 연골세포 수의 증가를 확인하였으며, 서마쑥 추출물이 DMM OA 모델에서 연골보호 효과를 가진다고 보고하였다[37]. 또한, Nanxing 등은 baicalein이 DMM OA모델에서 연골 표면의 파괴 및 침식을 억제하고, proteoglycan 분해를 억제하여 연골 두께를 증가시켰다고 보고하였다[38]. 본 연구에서 사용한 DMM OA 모델의 조직절편을 fastgreen/safranin-O 염색했을 때, 연골에 분포하는 proteoglycan 함량 및 표면 침식 정도가 석묵 추출물의 농도에 따라 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 실험 결과를 통해 DMM 유발 OA 모델에서 석묵 추출물이 연골 분해를 억제하고, 관절 연골의 손상을 감소시켰음을 시사한다.

## 제 5 절 결론

골관절염은 퇴행성질환 중 65세 노인에게서 흔히 발병하는 질병으로, 관절 연골의 변형, osteophyte 형성 및 통증을 수반한다. 석묵은 식용가능한 홍조류에 속하며, 예로부터 한국을 비롯한 아시아 지역에서 음식의 재료로 섭취해왔다. 석묵은 항염증 및 항산화 효과를 기반으로 대사 장애를 완화시킴으로써 체지방 감소에 효과가 있다고 보고되어 있다. 그러나 석묵의 골관절염 개선에 대한 효능은 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 석묵의 골관절염 개선에 대한 효능을 평가하였다.

1. 석묵 추출물의 전처리는 아질산염, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2, ADAMTS-5, ADAMTS-4, MMP-1, MMP-3, MMP-13을 포함한 염증 매개체 및 연골 분해 효소의 생성 및 발현을 억제하였다.
2. 석묵 추출물의 전처리는 IL-1 $\beta$ 에 의한 Collagen type II 및 proteoglycan의 분해를 억제하였다.
3. 석묵 추출물의 전처리는 NF- $\kappa$ B p65의 핵 전이를 억제하였으며, ERK, JNK 및 P38의 인산화를 억제함으로써 연골보호효능을 나타내었다.
4. *In vivo* study에서 내측 반월판 손상으로 인한 골관절염 실험동물을 구축하였으며, 석묵 추출물을 8주간 경구투여한 결과 추출물을 섭취한 군에서 유의적으로 연골이 보호됨을 확인하였다.

이러한 결과는 석묵 추출물이 연골보호 효능이 있음을 나타내며, 석묵 추출물이 골관절염 예방 혹은 지연을 위한 식품 혹은 의약품 개발의 후보 소재로써 제공 가능성을 시사한다.

## References

1. Xia B, Di Chen, Zhang J, *et al.* Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int.* 2014 Dec;95(6):495-505. doi: 10.1007/s00223-014-9917-9.
2. Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission. *Lancet.* 2020 Nov;396(10264):1711-1712. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32230-3.
3. Ji B, Guo W, Ma H, *et al.* Isoliquiritigenin suppresses IL-1  $\beta$  induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- $\kappa$ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection. *Int J Mol Med.* 2017 Dec;40(6):1709-1718. doi: 10.3892/ijmm.2017.3177
4. Ohashi H, Nishida K, Yoshida A, *et al.* Adipose-Derived Extract Suppresses IL-1  $\beta$ -Induced Inflammatory Signaling Pathways in Human Chondrocytes and Ameliorates the Cartilage Destruction of Experimental Osteoarthritis in Rats. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep;22(18):9781. doi: 10.3390/ijms22189781.
5. Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F. Interleukin-1  $\beta$  signaling in osteoarthritis - chondrocytes in focus. *Cell Signal.* 2019 Jan;53:212-223. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.10.005.
6. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2008 Feb;75(3):677-87. doi: 10.1016/j.bcp.2007.09.014.
7. Ahmad N, Ansari MY, Haqqi TM. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J Cell Physiol.* 2020 Oct;235(10):6366-6376. doi: 10.1002/jcp.29607.
8. Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhães J, Meijide-Failde R, Blanco FJ. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1  $\beta$ -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 Jul;22(7):1026-35. doi: 10.1016/j.joca.2014.04.031.
9. López-Ruiz E, Perán M, Cobo-Molinos J, *et al.* Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived

- stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Jan;21(1):246-58. doi: 10.1016/j.joca.2012.10.007.
10. Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, *et al*. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Feb;19(2):222-32. doi: 10.1016/j.joca.2010.11.004.
  11. Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev*. 2008 May;28(3):464-81. doi: 10.1002/med.20113.
  12. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, *et al*. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005 Mar;434(7033):644-8. doi: 10.1038/nature03369.
  13. Choi MC, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction. *Cells*. 2019 Jul;8(7):734. doi: 10.3390/cells8070734.
  14. Lu R, Wei Z, Wang Z, *et al*. Mulberroside A alleviates osteoarthritis via restoring impaired autophagy and suppressing MAPK/NF- $\kappa$ B/PI3K-AKT-mTOR signaling pathways. *iScience*. 2023 Jan;26(2):105936. doi: 10.1016/j.isci.2023.105936.
  15. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002 Dec;298(5600):1911-2. doi: 10.1126/science.1072682.
  16. Loeser RF, Erickson EA, Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep;20(5):581-6. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283090463.
  17. Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF- $\kappa$ B signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Nov;45(11):2580-4. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.018.
  18. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, *et al*. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015 Jul;386(9991):376-87. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3.
  19. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011 Jun;377(9783):2115-26. doi: 10.1016/S0140-

6736(11)60243-2.

20. Kobayashi M, Harada S, Fujimoto N, Nomura Y. Apple polyphenols exhibits chondroprotective changes of synovium and prevents knee osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jul;614:120-124. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.016.
21. Lee SA, Park BR, Moon SM, *et al.* Chondroprotective Effect of Cynaroside in IL-1  $\beta$ -Induced Primary Rat Chondrocytes and Organ Explants via NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Inhibition. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jan;2020:9358080. doi: 10.1155/2020/9358080.
22. Henrotin Y, Priem F, Mobasheri A. Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management. *Springerplus.* 2013 Dec;2(1):56. doi: 10.1186/2193-1801-2-56.
23. Seo KS, Cho TO, Park JS, *et al.* Morphology, basiphyte range, and plastid DNA phylogeny of *Campylaephora borealis* stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Taxon.* 2003 Feb;52:9-19. doi: 10.2307/3647434.
24. Murakami S, Hirazawa C, Yoshikawa R, *et al.* Edible red seaweed *Campylaephora hypnaeoides* J. Agardh alleviates obesity and related metabolic disorders in mice by suppressing oxidative stress and inflammatory response. *Nutr Metab (Lond).* 2022 Jan;19(1):4. doi: 10.1186/s12986-021-00633-5.
25. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020 Mar;104(2):293-311. doi: 10.1016/j.mcna.2019.10.007.
26. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Jan;21(1):16-21. doi: 10.1016/j.joca.2012.11.012.
27. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Jan;7(1):33-42. doi: 10.1038/nrrheum.2010.196.
28. Wang Z, Jones G, Winzenberg T, *et al.* Effectiveness of *Curcuma longa* Extract for the Treatment of Symptoms and Effusion-Synovitis of Knee Osteoarthritis : A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2020 Dec;173(11):861-869. doi: 10.7326/M20-0990.

29. Lee DG, Park SY, Chung WS, *et al.* Fucoidan Prevents the Progression of Osteoarthritis in Rats. *J Med Food*. 2015 Sep;18(9):1032-41. doi: 10.1089/jmf.2014.3334.
30. Yoon CH. Osteoarthritis update. *Korean J Med*. 2012;82(2):170-174. doi: 10.3904/kjm.2012.82.2.170.
31. Whittaker JL, Runhaar J, Bierma-Zeinstra S, Roos EM. A lifespan approach to osteoarthritis prevention. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021 Dec;29(12):1638-1653. doi: 10.1016/j.joca.2021.06.015.
32. Mével E, Merceron C, Vinatier C, *et al.* Olive and grape seed extract prevents post-traumatic osteoarthritis damages and exhibits *in vitro* anti IL-1 $\beta$  activities before and after oral consumption. *Sci Rep*. 2016 Sep;6:33527. doi: 10.1038/srep33527.
33. Khan NM, Haseeb A, Ansari MY, *et al.* Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes. *Free Radic Biol Med*. 2017 May;106:288-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.041.
34. Han SJ, Lim MJ, Lee KM, *et al.* Safflower Seed Extract Attenuates the Development of Osteoarthritis by Blocking NF- $\kappa$ B Signaling. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Mar;14(3):258. doi: 10.3390/ph14030258.
35. Nam DE, Kim OK, Shim TJ, Kim JH, Lee JM. Effect of *Boswellia Serrata* Extracts on Degenerative Osteoarthritis *in Vitro* and *in vivo* Models. *J Korean Soc Food Sci and Nutr*. 2014 May;43(5):631-640. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.5.631.
36. Yu H, Huang T, Lu WW, Tong L, Chen D. Osteoarthritis Pain. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr;23(9):4642. doi: 10.3390/ijms23094642.
37. Lee H, Jang D, Jeon J, *et al.* Seomae mugwort and jaceosidin attenuate osteoarthritic cartilage damage by blocking I $\kappa$ B degradation in mice. *J Cell Mol Med*. 2020 Jul;24(14):8126-8137. doi: 10.1111/jcmm.15471.
38. Yi N, Mi Y, Xu X, *et al.* Baicalein Alleviates Osteoarthritis Progression in Mice by Protecting Subchondral Bone and Suppressing Chondrocyte Apoptosis Based on Network Pharmacology. *Front Pharmacol*. 2022 Jan;12:788392. doi: 10.3389/fphar.2021.788392.

## 감사의 글

실험실에서 생활하는 동안 아이디어를 실험에 접목할 수 있도록 도움과 기회를 주신 김춘성 교수님, 덕분에 제가 다양한 연구를 해보며 많은 것을 배울 수 있었습니다. 또, 대학원 고민을 오래 했던 저를 이끌어 석사과정을 진학하게 해주신 덕분에 석사과정을 무사히 마무리할 수 있었습니다! 진심으로 감사드립니다.

짜학기 입학생이라 외로웠던 대학원 생활을 챙겨주시던 김도경 교수님, 항상 수업에서 교육과 관련해서 많은 가르침을 주시며 게으른 제게 학구열을 넘치게 만들어주신 김재성 교수님, 교수님들이 계셨기에 연구자의 꿈을 놓치지 않고, 대학원 생활 즐겁게 할 수 있었습니다! 도전하는데 두려움이 큰 제게 교수님들께서 계셨기에 도전할 수 있었습니다. 진심으로 감사드립니다.

제가 실험실에 있는 동안 바쁜 와중에도 저의 부족했던 부분을 채워주신 이슬아 박사님, 질문봇인 저에게 설명과 조언을 아끼지 않은 한설희 선생님, 실험실 생활 중에 긴 시간은 아니더라도 저에게 많은 영향을 주고 성장하도록 도움을 준 실험실 연구원 및 센터 선생님들, 든든하게 내 동기이자 동료가 되어준 예비 박사 향이, 정연이, 지은이, 혜원이.

전공은 다르지만 이야기 메이트가 되어 항상 응원해준 은지쌤, 무엇이든지 열심히 하는 적극왕 수지언니, 여전히 날 지지해주는 내 동기 민영언니, 만나면 공감과 조언이 가득한데, 좋은 곳도 데려가서 힐링까지 시켜주는 나의 멘탈 관리자 민경언니랑 수진이, 가고 싶은 맛집은 어디든지 나랑 탐방해주는 박보람, 고등학교때부터 한결같이 항상 의지되었고, 앞으로도 의지가 될 내 소중한 친구 혜인이랑 지수, 여러분들이 있었기에 제가 실험실 생활을 잘 마무리 할 수 있었습니다

보통 아빠들과 달리 내 이야기를 잘 들어주는 다정한 우리 아빠, 한결같이 앞으로 나아가는 멋진 나의 롤모델 우리 엄마, 넘치는 학구열로 항상 열심히 하고, 그에 따른 멋진 결과를 만들어내는 우리 언니, 우리 가족이 있어서 내가 대학원 진학을 생각했고 잘마무리 할 수 있었어. 언제나 지금처럼 사랑해!