

Veronica incana 추출물의 생물학적 활성 평가

신미래^{1#}, 윤미영^{1#}, 김민주^{1,2}, 정일하¹, 안희연¹, 정지원^{1,3}, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터
3 : 충남대학교 시스템생명과학대학

Evaluation of Biological Activity of *Veronica incana* Extracts

Mi-Rae Shin^{1#}, Mi Yeong Yoon^{1#}, Min Ju Kim^{1,2}, Il-Ha Jeong¹, Hui Yeon An¹
Ji-Won Jung^{1,3}, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

2 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University

3 : Department of Microbiology and Molecular Biology, College of Bioscience & Biotechnology, Chungnam National University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to evaluate the potential biological activity of *Veronica incana* extracts (VIE) through in vitro, ex vivo, and in vivo experiments.

Methods : In vitro, we conducted analyses on the total polyphenol (TP) and total flavonoid (TF) levels, alongside DPPH and ABTS radical scavenging activities. Ex vivo evaluations on adipose tissue measured glycerol release as a marker of lipolysis. In LPS-induced RAW 264.7 cells, we quantified nitric oxide (NO) production. Following H₂O₂ induction in U2OS cells, we performed mitochondrial assays such as MitoSox and MitoTracker. Moreover, Bodipy assays were conducted in 3T3-L1 cells. In vivo, we performed anti-osteoarthritis effect of VIE against monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis in rats.

Results : The results presented encompass a myriad of models, from cell culture to animal experiments as well as ex vivo studies. VIE demonstrated high TP and TF contents, potent DPPH and ABTS scavenging activities, and regulated glycerol release. Moreover, the inhibition of NO production in LPS-induced inflammation was notably confirmed and the reduction of lipid droplets was distinctly shown. Furthermore, in H₂O₂-induced U2OS cells, MitoSox was effectively reduced while MitoTracker noticeably increased. In vivo assays confirmed a significant increase in hindpaw weight distribution (HWD) decreased by MIA after VIE treatment. Additionally, VIE inhibited serum inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) and MDA levels in joint tissue.

Conclusion : In conclusion, *Veronica incana* exhibited various pharmacological effects including antioxidant, anti-obesity, and anti-inflammatory properties.

Key words : *Veronica incana*, antioxidant, anti-obesity, anti-inflammatory

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Mi-Rae Shin, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : with750@naver.com

Mi Yeong Yoon, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : vkdvkd125@naver.com

· Received : 15 April 2024 · Revised : 27 April 2024 · Accepted : 25 May 2024

I. 서론

고대부터 현대에 이르기까지 많은 식물이 전통 의학에 사용되었다¹⁾. 최근에는 새로운 분석법이 개발되어 다양한 활성 스펙트럼을 갖는 식물화학물질을 분석하고 식별할 수 있게 되었다. 따라서 역사적인 식물화학 연구와 식물의학에서의 활용이 크게 증가하는 추세이다²⁾.

Veronica 속 (꼬리풀속)은 speedwell, bird's eye, gypsy weed 등으로 불리며, 전 세계적으로 450종이나 교잡을 통한 새로운 품종 개발로 그 수가 계속적으로 증가하고 있다³⁾. Veronica 속은 100가지 이상의 식물화학물질을 포함한 다양한 화합물을 가지고 있으며, 이는 주로 이리도이드 배당체와 페놀성 화합물로 주로 구성되어 있다⁴⁾. 이 식물은 상처, 류머티즘, 객혈, 후두 인두염, 탈장, 폐 및 호흡기 질환 (예: 기침 또는 거담제) 치료를 위해 전통적으로 사용되었다⁵⁾. 예를 들어, Veronica 속 중 *Veronica peregrina*는 출혈, 위궤양, 감염, 대식세포 매개 염증성 질환 등과 관련된 질병의 치료 및 항암 치료에 유용하다고 알려져 있다⁶⁾. *Veronica spicata*로 만든 차는 항산화 및 항균 작용을 가지고 있어 기침 및 목 헹굼용 거담제로 사용되고 있다⁷⁾. 또한, *Veronica officinalis* (일반적인 speedwell)은 발칸 전통 의학에서 간, 습진, 궤양, 뱀 물림, 상처 치유 및 피부 병변 치료에 사용된다⁸⁾. 그리고 다양한 Veronica 속의 지상부에서 얻은 추출물은 전 세계적으로 암 치료를 위한 민간요법으로 사용되고 있다⁹⁾.

최근 국내에서도 온도에 따른 자생 꼬리풀속 8종의 발아에 대한 연구, 자생 꼬리풀속의 개화 및 광에 대한 연구, 꼬리풀아속의 계통 및 생물지리학적 연구, 한국산 꼬리풀속의 성분 분석 등 다양한 연구가 진행되고 있다¹⁰⁾. 그러나 Veronica 속에 속하는 *Veronica incana*에 대한 생리 활성 연구는 부족하며, 이 식물의 효과와 그 작용 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

이에 본 연구에서는 *Veronica incana*의 다양한 생리 활성을 탐구하기 위해 in vitro, ex vivo 및 in vivo 실험을 수행하여 *Veronica incana*의 기능성 식품 소재로서의 잠재 가능성을 조사하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

이 실험에 사용된 *Veronica incana* extracts (VIE)는 Traditional Medical Research Institute (TMRI, Ulaanbaata, Mongolia)로부터 공급받았다. *Veronica incana* (200 g)에 10배량의 증류수를 첨가하여 100°C에서 2시간 동안 추출한 후 감압으로 농축하였으며, 동결건조된 파우더는 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

2. 시약

Gallic acid, quercetin, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 그리고 7 mM의 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) 및 monosodium iodoacetate (MIA)는 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. In vitro 항산화 활성 측정

VIE의 total polyphenol (TP) 및 total flavonoid (TF) 함량 및 DPPH와 ABTS radical의 소거능은 기존에 사용한 프로토콜에 따라 측정되었다¹¹⁾. TP는 mg gallic acid equivalents (GAE)/g으로, TF는 mg quercetin equivalents (QE)/g으로 환산되었으며, DPPH와 ABTS radical의 소거능은 IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration)로 표시되었다.

4. Ex vivo glycerol release 분석

25~30 g의 수컷 마우스로부터 부고환주위지방을 분리하여 세절하고, 각각의 시험관에 HBSS에 1% free fatty acid (FFA) free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)을 넣어 150 mg/mL로 준비한다¹²⁾. VIE와 양성대조약물인 isoproterenol를 2 µg/mL로 각각 e-tube에 넣은 후, 37°C의 환경에서 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 상층액을 채취한 후, 지방이 분해되어 유출된 glycerol의 양을 glycerol assay kit (Cat, MAK117, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다.

5. In vitro RAW 264.7 세포 분석

RAW 264.7 세포는 American-type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하였으며, 세포 배양은 DMEM (Hyclone, UT, USA) 배지에 10% FBS (Gibco, CA, USA)를 첨가하여 37°C 및 5% CO₂의 세포 배양기에서 수행되었으며, 배지에는 1% 페니실린이 첨가되었다. 세포중식률을 알아보기 위해 96 well에 5×10³ cells/well로 분주하여 24시간 안정화시켰으며, VIE는 다양한 농도 (50, 100, and 200 µg/mL)로 LPS (0.5 µg/mL) 처리 4시간 전에 처리하였다. 그리고 16시간 동안 배양한 후, WST-8 시약 (Cat, #10010199, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)을 90분간 처리한 다음, 상층액을 회수하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포중식률은 Normal군의 수치로 정규화하여 표시하였다. Nitric oxide (NO) 생성량은 Promega Corporation의 지시에 따라 CytoTox-96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. In vitro U2OS 세포 분석

세포중식률 실험에서는 각 well에 4×10³ cells를 200 µL 씩 배양하여 24시간 동안 진행하였다. VIE는 4시간 동안 전 처리한 후에 H₂O₂ 500 µM을 처리하고 overnight을 유지하

였다. 세포증식률은 CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies Inc, Kumamoto, Japan)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 미토콘드리아의 활성산소종 (ROS) 측정 및 막전위 변화는 MitoSox™ (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)와 MitoTracker™ (MitoTracker™ Red CMXRos, Invitrogen™)를 이용하여 분석하였다. MitoSox가 처리된 세포는 배양기에서 20분 동안 유지하였고, 4% PFA를 이용하여 세포를 고정한 후 Red signal은 Olympus BX51 Microscope를 이용하여 200배 조건에서 분석하였다. 또한, LIVE/DEAD 세포 분석 실험은 Thermo Fisher Scientific사의 상업용 제품 (L3224)을 구매하여 측정하였으며, 형광 염색 이미지는 형광 필터가 장착된 현미경 Olympus BX51 Microscope (Olympus Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다.

6. In vitro 3T3-L1 세포 분석

3T3-L1 지방세포에서 중성 지질을 검출하기 위해 Bodipy (D3922, Thermo Fisher Waltham, MA, USA) 염색을 수행하였다. 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 접종하고 배양기에서 overnight하였다. 그 후, 세포를 VIE로 전처리하고 oleic acid (OA) 250 μ M로 6시간 동안 배양하였다. OA 처리 후, 세포를 PBS (pH 7.3, 10 mM)로 2회 세척하고, 2 μ M의 Bodipy를 첨가한 후 암실에서 실온에서 배양하였다. 형광 염색 이미지는 형광 현미경인 Olympus BX51 Microscope를 사용하여 신호를 감지하였다.

7. In vivo 골관절염 동물실험

7주령 수컷 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐를 DBL (Eumseong, Korea)에서 구입하여 일주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실 환경조건은 명암 주기는 12시간 주기이며, 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 5\%$ 로 조절하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인 (번호: DHU2022-067)을 얻어 동물실험을 진행하였다.

정상군 ($n = 7$)을 제외한 모든 흰쥐는 골관절염 유발을 위해 우측 무릎 관절낭 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유도 물질인 MIA를 31G insulin 주사기 (8 mm, Becton Dickinson and Company, NJ, USA)를 사용하여 우측 무릎 관절강에 50 μ L (80 mg/mL)씩 주입하였다. MIA 투여 일주일 후에 뒷다리 체중 부하를 측정하였고¹³⁾, 골관절염이 유발된 흰쥐를 대조군 (MIA), indomethacin 2 mg/kg로 경구 투여한 양성 대조군 (INDO), VIE 200 mg/kg로 경구 투여한 실험군 (VI)으로 각 군당 7마리씩 나누어 실험을 진행하였다. Indomethacin과 VIE는 하루에 한 번씩, 2주 동안 경구 투여하였다. 뒷다리 체중 부하 (%) 공식은 골관절염이 유발된 오른쪽 뒷다리 부하량 (g)/정상 왼쪽 뒷다리 부하량 (g) \times 100으로 산출하였다.

실험 종료 후, isoflurane (Troikaa pharmaceuticals Ltd., Gujarat, India)을 사용해 흡입 마취를 시행하고 혈액을 복대

정맥에서 채취하였으며, 관절 조직을 채취하였다. 그 후, 채취한 혈액은 4°C 에서 1,508 x g로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다.

1) 혈청 내 염증성 사이토카인 분석

혈청 내의 염증성 사이토카인 측정은 Koma Biotech (Seoul, Korea)의 TNF α , IL-1 β , 및 IL-6 assay kit를 사용하여 측정하였다. 각 well에 표준물질과 혈청 100 μ L를 넣고, plate sealer로 덮어서 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 이후에 혈청과 표준물질을 제거하고, wash buffer로 세척한 후, 각각의 검출 항체 100 μ L를 넣고 plate sealer로 덮어서 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 그리고, 남은 액체를 제거하고, wash buffer로 세척한 후, streptavidin-HRP 100 μ L를 넣어서 30분 동안 실온에서 배양하였다. 그 후, 남은 용액을 제거하고 wash buffer로 세척한 후, 각 well에 TMB solution 100 μ L를 넣고 실온에서 배양한 다음, 적절한 발색이 나타나면 stop solution 100 μ L을 넣어주었다. 마지막으로, Microplate reader (Tecan, Infinite M200 pro, Switzerland)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Malondialdehyde 분석

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 방법으로 관절 조직에서 분리된 세포질 내 MDA를 측정하였다¹⁴⁾. Microplate reader를 사용해 540 nm에서 OD값을 측정하였으며, 표준물질 MDA 시약을 사용하여 표준 검량선을 구하였다.

8. 통계분석

모든 수치는 평균 (mean)과 표준오차 (SEM)로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후 검정을 실시하였다. 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p -value < 0.05 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. In vitro 항산화 활성 측정

VIE의 TP와 TF 함량을 측정한 결과, TP의 경우 108.87 ± 0.55 mg (GAE)/g으로 나타났으며, TF 함량은 39.59 ± 0.31 mg(QE)/g 함량을 나타냈다 (Table 1). VIE의 radical 소거능을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS 분석을 실시하였으며, 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid을 사용하였다. VIE의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, IC₅₀ 값은 8.78 ± 0.12 μ g/mL로 나타났으며 (Figure 1A), ABTS radical 소거 활성은 IC₅₀ 값은 21.92 ± 0.40 μ g/mL로 높은 항산화 활성을 나타냈다 (Figure 1B).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of VIE.

Sample	Total polyphenol (mg (GAE)/g)	Total flavonoid (mg (QE)/g)
VIE	108.87 ± 0.55	39.59 ± 0.31

All values are expressed as mean ± SEM. VIE, *Veronica incana* extracts.

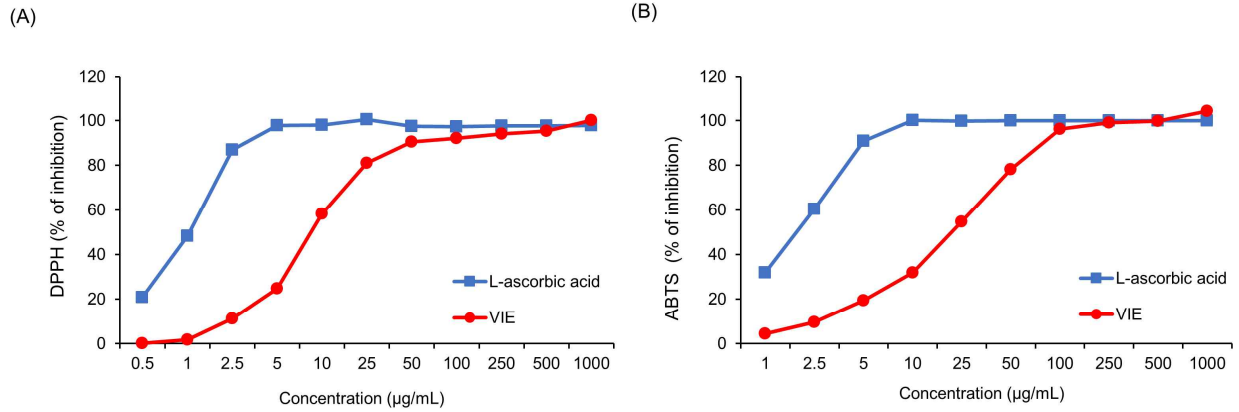


Figure 1. DPPH and ABTS radical scavenging activities of VIE. (A) DPPH radical scavenging activity, (B) ABTS radical scavenging activity. The DPPH and ABTS radical scavenging activities were expressed as IC₅₀ (µg/mL). Values are mean of three replicate determinations ± SEM.

2. Ex vivo glycerol release 분석

VIE의 지방분해 효과는 fat pad를 이용하여 glycerol이 배출되는 함량을 측정하여 확인하였으며, VIE는 2 µg/mL로 처치하였다. 그 결과, Normal군은 6.9 ± 0.0 mg/dL/hr였

으며, VIE의 경우는 25.0 ± 0.3 mg/dL/hr로 glycerol 배출이 정상군 대비 3.6배 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였다 (Figure 2).

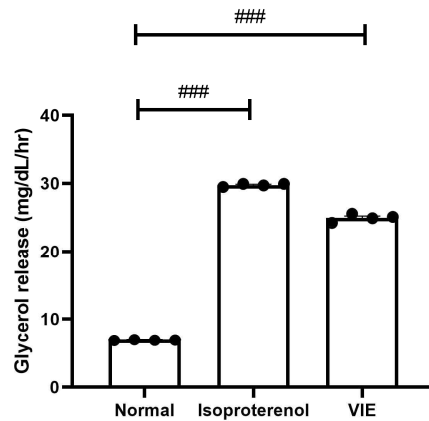


Figure 2. Effect of VIE on release of glycerol. All values are expressed as mean ± SEM (n = 4/group). ### $p < 0.001$, significant difference compared with the Normal group.

3. In vitro RAW 264.7 세포 분석

VIE의 RAW 264.7 세포에서 세포증식률을 확인하기 위해 VIE를 50, 100 및 200 µg/mL로 처리한 후, WST-8시약을 처리하여 분석한 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다 (Figure 3A). 또한, VIE이 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성 억제에 대한 효과를 분석한 결과, LPS만 처리한 대

조군은 Normal군에 비해 31.7배 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으나 VIE 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 특히, VIE 200 µg/mL를 처리하였을 시, LPS만 처리한 대조군에 비해 71.1%의 NO 생성 억제를 보여 주었다 (Figure 3B).

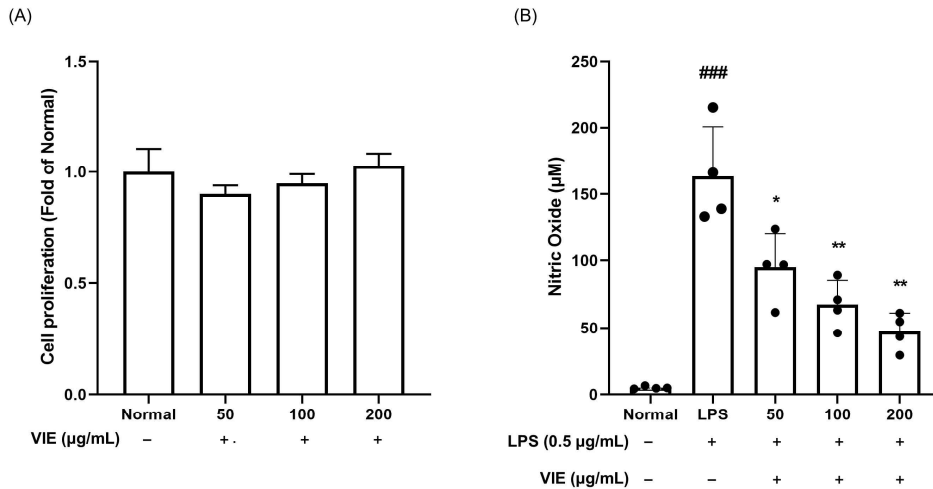


Figure 3. Effect of VIE on cell proliferation and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cell proliferation of VIE, (B) NO production, Raw264.7 cells were stimulated with 0.5 µg/mL of LPS. VIE supplied with different doses (50, 100, and 200 µg/mL) prior to LPS induction. All values are expressed as mean ± SEM (n = 4/group). ###*p* < 0.001, significant difference compared with the Normal group and **p* < 0.05, ***p* < 0.01, significant difference compared with the LPS group. Normal, Treated with media only.

4. In vitro U2OS 세포 분석

VIE의 U2OS 세포에서 세포증식률을 확인하기 위해 VIE를 50, 100 및 200 µg/mL로 처리한 후, WST-8시약을 처리하여 분석한 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다 (Figure 4A). 또한, VIE이 H₂O₂ 처리 후, 유발된 산화 스트레스에 대한 Dead cell intensity를 분석한 결과, H₂O₂만 처리한 대조군은 Normal군에 비해 14.6배 유의하게 (*p* < 0.001) 증가하였으나 VIE 200 µg/mL 처리에 의해 유의하게 (*p* < 0.01)

감소하는 것을 확인하였다. 특히, VIE 200 µg/mL 처리는 H₂O₂만 처리한 대조군에 비해 12.91%의 억제하였다 (Figure 4B). 또한, 미토콘드리아의 ROS는 MitoSox staining으로, 미토콘드리아의 integrity는 MitoTracker staining으로 평가하였으며, VIE 처리는 미토콘드리아의 ROS를 H₂O₂만 처리한 대조군 대비 22.54% 유의하게 억제시켰으며, 미토콘드리아의 막전위 변화를 H₂O₂만 처리한 대조군 대비 1.9배 증가로 효과적으로 개선시켰다 (Figure 5).

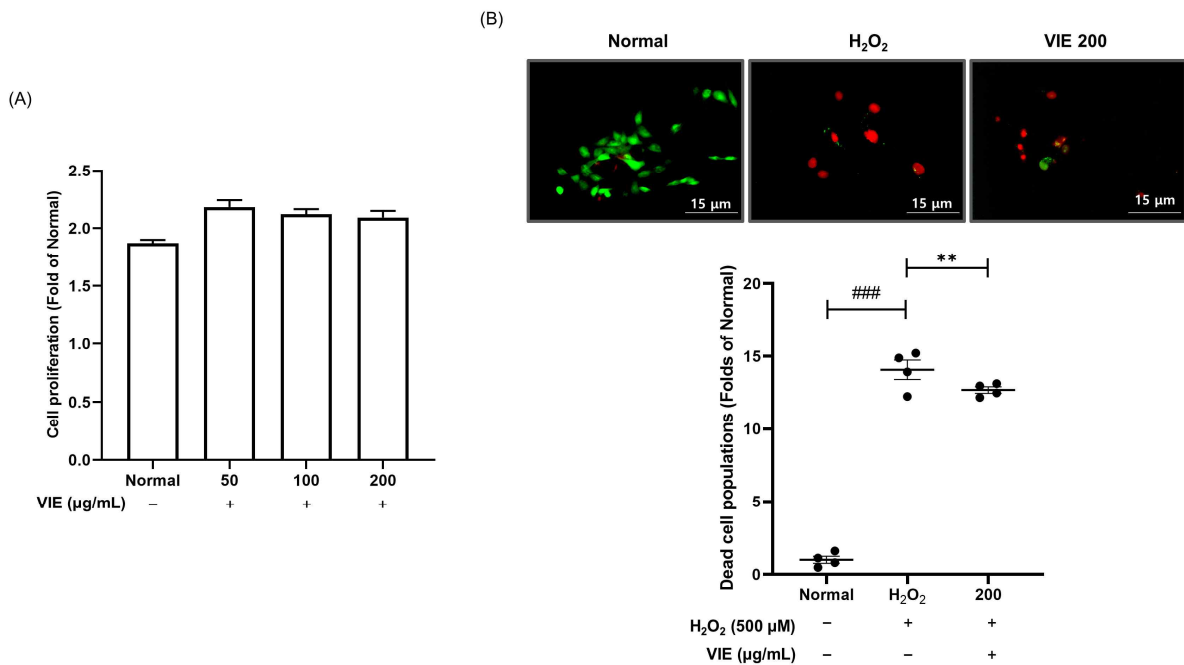


Figure 4. Effect of VIE on cell proliferation and Dead cell populations in H₂O₂-induced U2OS cells. (A) Cell proliferation of VIE, (B) Dead cell populations (Calcein live dye (green) and Ethidium dead dye (red) staining, 200X, scale bar 15 µm). U2OS cells were induced with H₂O₂ 500 µM. VIE supplied with 200 µg/mL prior to H₂O₂ stimulation. All values are expressed as mean ± SEM (n = 4/group). ###*p* < 0.001, significant difference compared with the Normal group and ***p* < 0.01, significant difference compared with the H₂O₂ group.

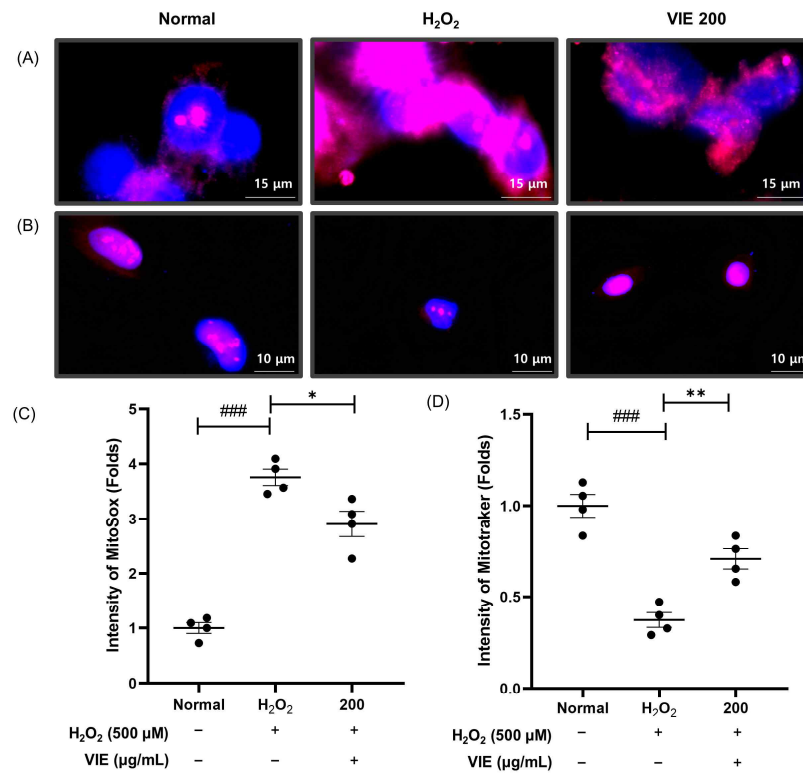


Figure 5. Effect of VIE on MitoSox and MitoTracker staining in H₂O₂-induced U2OS cells. (A) The representative image of MitoSox staining (630X, scale bar 15 μm), (B) The representative image of MitoTracker staining (400X, scale bar 10 μm), (C) Intensity of MitoSox, (D) Intensity of MitoTracker. U2OS cells were induced with H₂O₂ 500 μM. VIE supplied with 200 μg/mL prior to H₂O₂ stimulation. All values are expressed as mean ± SEM (n = 4/group). ###*p* < 0.001, significant difference compared with the Normal group and **p* < 0.05, ***p* < 0.01, significant difference compared with the H₂O₂ group. Normal, Treated with media only.

5. In vitro 3T3-L1 세포 분석

3T3-L1 세포에서 지질을 검출하기 위해 Bodipy 염색을 한 결과, Normal군 대비 Oleic acid만 처리한 대조군은 지질이

유의하게 (*p* < 0.001) 7.14배 축적되어 있는 것을 확인하였고, 이러한 축적은 VIE 200 μg/mL 처치에 의해 16.96% 유의하게 (*p* < 0.05) 감소하였다 (Figure 6).

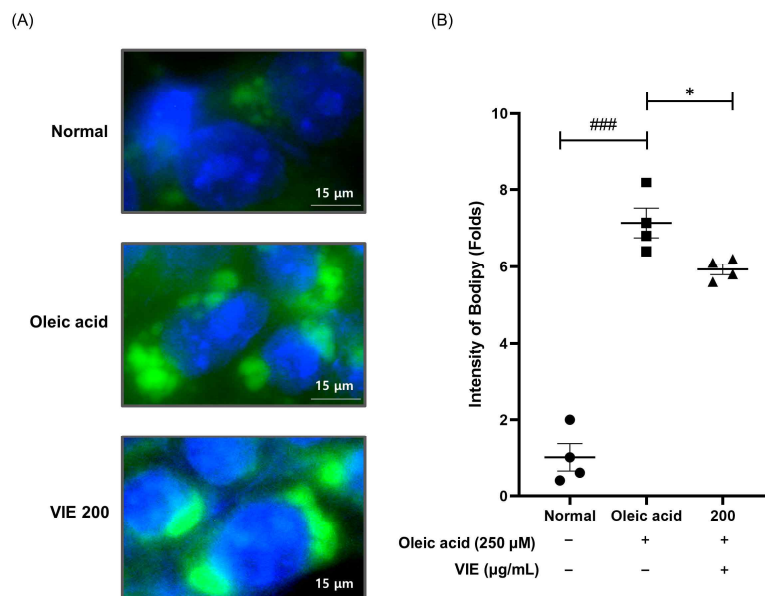


Figure 6. Effect of VIE on lipid staining in oleic acid-induced 3T3-L1 cells. (A) The representative image of Bodipy, (B) Intensity of Bodipy 3T3-L1 cells were induced with oleic acid 250 μM. VIE supplied with 200 μg/mL prior to oleic acid stimulation. All values are expressed as mean ± SEM (n = 4/group). ###*p* < 0.001, significant difference compared with the Normal group and **p* < 0.05, significant difference compared with the Oleic acid group. Normal, Treated with media only.

6. In vivo 골관절염 동물실험

실험기간 동안 측정된 체중의 변화 (g)는 정상군 60.1 ± 2.4 , MIA군 65.6 ± 1.6 , INDO군 61.1 ± 5.4 , VI군 70.1 ± 6.2 로 나타났다. MIA로 골관절염을 유발 후 14일간의 체중 측정에서 모든 실험군에서 체중이 증가하였으나 각 실험군 간의 유의성은 보이지 않았다 (Figure 7A). 또한, 골관절염이 유발된 흰쥐의 통증 변화를 평가하기 위하여 뒷다리 체중 부하를 측정하였다. 정상군의 뒷다리 체중 부하를 100으로 환산했을 때, MIA 투여 일주일 후 0 day에는 정상군 대비 모든 골관절염 유발군에서 유의하게 감소함을 보여주었다. 하지만, 7일 동안 약물을 투여하였을 때, MIA군 대비 약물군이 유의하게 증가함을 볼 수 있었다 ($p < 0.001$). 이러한 효과는 약물투여 14일 까지 지속이 되었다 ($p < 0.001$). 결과적으로 실험기간 2주 경과 시, 정상군 대비 MIA군은 37.5%가 회복되지 못했으며,

INDO군은 31.5%, VI군은 22.7%로 나타났다. 따라서, VIE의 경우투여는 통증의 빠른 회복을 도와주는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7B).

추가적으로 혈청에서 염증성 사이토카인 및 관절 조직에서의 MDA를 측정하였다. 그 결과, MIA의 골관절염 유도에 의해 정상군 대비 MIA군에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 MDA의 수준이 유의하게 증가함을 보여주었고 (TNF- α , $p < 0.01$; IL-6, $p < 0.001$; IL-1 β , $p < 0.001$, MDA, $p < 0.001$) 이러한 증가된 수준은 VIE의 경우투여에 의해 유의하게 감소하였다 (TNF- α , 30.4%; IL-6, 27.0%; IL-1 β , 65.6%; MDA, 73.4%). 특히, IL-1 β 의 경우 INDO군보다 VI군에서 유의하게 억제하는 것으로 나타나 ($p < 0.05$) VIE의 경우투여는 염증성 사이토카인인 IL-1 β 를 경유하여 골관절염을 더 효과적으로 완화시키는 것으로 판단된다 (Figure 8).

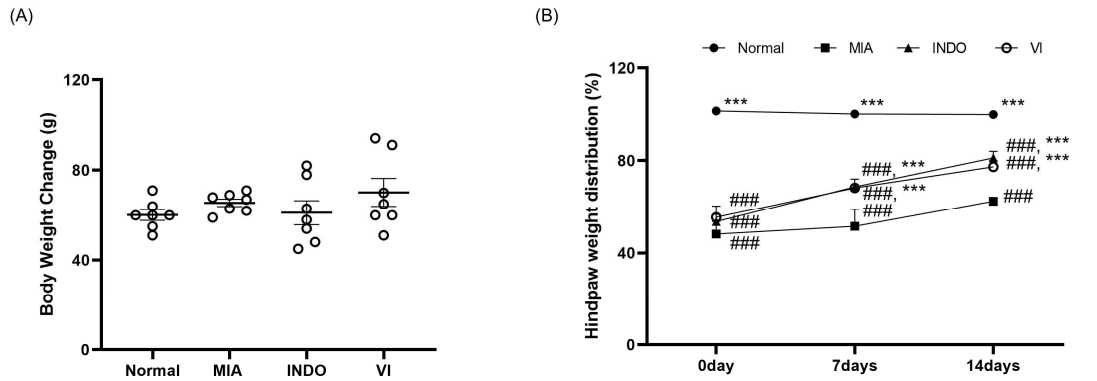


Figure 7. Effect of VIE on body weight changes and the relative changes of hind paw weight distribution. (A) body weight changes during the experimental period, (B) the relative changes of hind paw weight distribution. All values are expressed as mean \pm SEM ($n = 7$ /group). ### $p < 0.001$, significant difference compared with the Normal group and *** $p < 0.001$, significant difference compared with the MIA group.

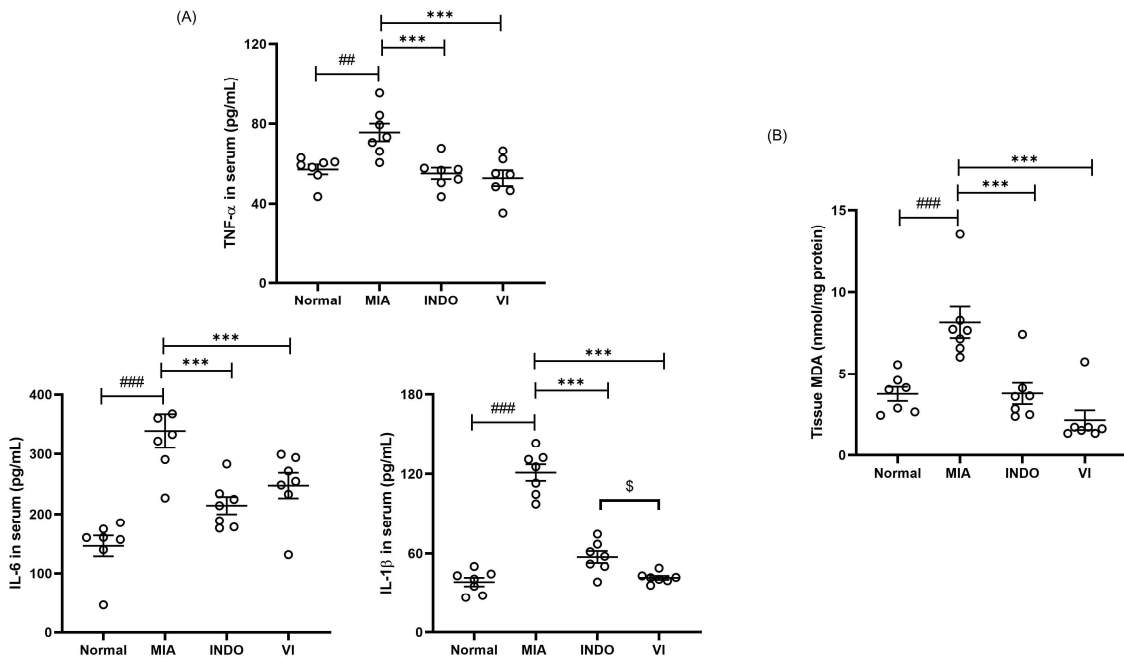


Figure 8. Effect of VIE on serum pro-inflammatory cytokines and tissue MDA level. (A) the levels pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum, (B) tissue MDA level. All values are expressed as mean \pm SEM ($n = 7$ /group). ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant difference compared with the Normal group, *** $p < 0.001$, significant difference compared with the MIA group. and $^{\S}p < 0.05$, significant difference compared with the INDO group.

IV. 고 찰

과거에는 전통 의학이 소수의 사람들에게만 알려진 지식이었지만, 현대에는 전 세계적으로 받아들여지는 의료 체계로 발전하였다¹³⁾. 이런 변화는 기술 발전으로 가능해졌다. WHO에 따르면, 전 세계 인구의 약 80%가 여전히 식물을 기반으로 한 약물을 사용하고 있다. 몇몇 의약품은 여전히 약용 식물에서 유래되었다¹⁴⁾. 오랫동안 천연자원이 치료 약물로 사용되어왔으며, 이를 찾는 것은 여전히 중요한 과제이다. 약용 식물을 연구함으로써 우리는 다양한 치료 목표에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있다.

Veronica는 현화식물인 Plantaginaceae (질경이과)에서 가장 큰 속에 속하며, 이 중 *Veronica incana*는 일반적으로 silver speedwell이라고 불린다. 또한, *Veronica spicata*의 아종으로 (*Veronica spicata* subsp. *incana*) 간주되며⁷⁾, 다년생 식물로 동유럽 일부 지역과 러시아, 시베리아 전역, 몽골 및 중국 북부가 원산지이다. 상부 호흡기 질환, 약성 신생물, 위장관 및 비뇨생식기 장애, 당뇨병, 부종 및 상처 치료를 위해 전통 의학에서 사용되었다¹⁵⁾. 하지만 *Veronica incana*에 대한 생리 활성 연구가 충분하지 않아, *Veronica incana*의 효과와 그 기전에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 *Veronica incana* extracts (VIE)을 이용한 in vitro, ex vivo 및 in vivo 실험을 통해 *Veronica incana*의 효과와 그 작용 기전을 밝히고자 하였다.

세포는 정상적인 상황에서 산화와 항산화 작용이 균형을 이루고 있으나 그 균형이 깨지면 산화 스트레스가 발생하게 된다. 과도한 산화 스트레스를 방지하기 위한 방안으로 내인적으로 효소 활성에 의한 과도한 radical 발생으로 인한 산화 과정을 줄이거나 항산화 물질이 풍부한 항산화제를 외인적으로 공급해 줄 수 있다¹⁶⁾. 항산화제는 주로 페놀 구조를 가지며 대표적으로 플라보노이드를 들 수 있다. VIE의 in vitro에서 항산화 잠재력을 평가하기 위해 TP과 TF 함량을 측정하고, DPPH와 ABTS radical 소거능을 분석하였다. DPPH assay는 페놀성 화합물의 항산화 능력을 평가하는데 사용되며, ABTS assay는 넓은 pH 범위에서 친유성 및 친수성 화합물의 항산화 능력을 측정할 수 있다¹⁷⁾. Radical 소거능은 IC₅₀값으로 표시하며, radical의 50%를 제거하는 데 필요한 시료의 최소 농도를 의미한다. 따라서, IC₅₀이 낮을수록 항산화 활성 능력이 높은 것으로 평가된다¹⁸⁾. 항산화 능력을 측정된 결과 (Table 1, Figure 1), VIE는 높은 TP와 TF를 함유하고 있었으며, DPPH와 ABTS radical 소거능에서 우수한 억제 효과를 보였다.

지방 조직 지방 분해 (lipolysis)는 지방 세포에 저장된 중성 지방 (TG)가 분해되고, 지방산 (fatty acid)과 글리세롤 (glycerol)이 방출되는 이화 과정이다¹⁹⁾. 이에 ex vivo glycerol release를 분석을 실시하였을 시 (Figure 2), glycerol 배출이 Normal 대비 3.6배로 유의하게 증가하였고, 이는 VIE의 효과적인 지방분해 효과를 의미한다.

다양한 세포실험 (RAW 264.7 세포, U2OS 세포, 3T3-L1 세포)을 통해 VIE의 항염증과 항산화 및 항비만 효과에 대한 추가적인 생리 활성을 평가하였다.

Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 264.7 세포에

서는 NO의 생성량을 측정하였다. LPS가 세포막에 있는 Toll-like receptor 4 (TLR4)에 결합하게 되면 염증 신호가 세포 내로 전달되게 되고, Nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 같은 전사 인자는 염증성 매개체인 inducible nitric oxide synthases (iNOS)를 유도하게 된다. 최종적으로 iNOS는 NO를 생성하게 되고, 사이토카인에 의해 자극을 받으면 더 많은 양의 NO를 생산하게 된다²⁰⁾. 본 실험 결과 (Figure 3), VIE 200 μ g/mL를 처리하였을 시, LPS만 처리한 대조군에 비해 71.1%의 NO 생성 억제력을 보여주었다. 이는 VIE가 NO의 억제력을 통해 염증을 효과적으로 감소시킬 것으로 판단되어진다.

과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)로 산화 스트레스를 유도한 U2OS 세포에서 VIE의 미토콘드리아의 활성산소종 (ROS)은 산화 스트레스와 세포 병리 생리학 사이에 깊은 연관성을 가지고 있다. MitoSox는 미토콘드리아 ROS, 특히, 초과산화물을 찾아내는 데에 널리 사용되는 것으로 알려져 있으며²¹⁾, 미토콘드리아의 막전위 변화는 MitoTracker로 평가하게 된다. 여기서 MitoTracker는 살아있는 세포의 미토콘드리아의 원형질 막을 통과할 수 있는 선택적 친유성 양이온 형광 염료이다²²⁾. U2OS 세포에 H₂O₂ 처리 후, 유발된 산화 스트레스에 대한 Dead cell intensity를 분석한 결과 (Figure 4), VIE 200 μ g/mL 처리는 H₂O₂만 처리한 대조군 대비 12.91% 가량 유의하게 억제시켰다.

VIE 처치는 미토콘드리아 ROS를 유의하게 억제하였으며, 미토콘드리아의 integrity는 유의하게 증가하여 막전위 변화를 개선했다. H₂O₂의 처리는 ROS를 유의하게 증가시켰으며, VIE의 처치에 의해 22.54% 유의하게 감소하였다. 또한, 62.73%로 유의하게 감소된 MitoTracker는 VIE의 처치에 의해 1.9배 유의하게 증가하였다 (Figure 5). 이를 통해 VIE는 미토콘드리아의 ROS를 억제시킬 뿐만 아니라 미토콘드리아의 기능을 개선하는 것으로 판단된다.

또한, 3T3-L1 세포에 oleic acid를 처리하면 지질 축적이 유발된다. 지질 축적 정도는 살아있는 세포의 지질 축적에 대한 마커인 Bodipy를 이용하여 측정하였다²³⁾. Oleic acid만을 처리한 군은 지질이 7.14배 축적되었으나 VIE 200 μ g/mL 처치에 의해 16.96% 유의하게 감소하였다 (Figure 6). 이를 통해 VIE 처치는 지질 축적을 억제하여 항비만 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

마지막으로 in vivo 골관절염 동물실험을 통해 항골관절염 효과를 평가하였다. 퇴행성 관절염인 골관절염은 관절 연골의 손상과 연관된 만성 질환이다. 이로 인해 관절에서 소실된 연골 조직이 발생하며, 이는 관절 주변의 뼈, 관절막, 인대 등에 영향을 주어²⁴⁾ 지속적인 통증, 운동 제약, 관절 형태 변형, 강직감 및 기능 감소가 나타나 삶의 질을 저하시킨다²⁵⁾. 골관절염은 monosodium iodoacetate (MIA)의 관절강 내 주입으로 유도하며 이러한 동물모델은 연골의 손상 및 통증 등이 실제의 골관절염과 유사하다고 보고되어있다²⁶⁾. 이에 본 연구에서는 VIE가 골관절염이 유발된 동물모델에서 뒷다리 체중 부하 측정, 혈청 내 염증성 사이토카인 분석, 관절 조직의 MDA 측정을 통해 골관절염에 대한 효과에 대해 조사하였다. MIA로 골관절염을 유발 후 14일간의 체중 측정 변화 (g)를 분석하였을 시, 모든 실험군에서 체중이 증가하였으나 각 실험군 간의 유의성은 보이지 않았다 (Figure 7A). 또한, MIA 투여

일주일 후 0 day에는 정상군 대비 모든 골관절염 유발군에서 뒷다리 체중 부하 (%)가 유의하게 감소함을 보여주었다. MIA를 오른쪽 관절강 내에 투여하면 오른쪽 뒷다리에 관절염이 유발되고, 이에 따른 통증으로 인해 오른쪽 뒷다리를 지지하는 힘이 약해진다. 따라서, 뒷다리 체중 부하 (%)를 평가하면 정상군 대비 유의하게 감소한다. 그러나, 약물 투여 후 7일부터는 뚜렷하게 개선되었으며, 실험 종료 시에는 정상군 대비 MIA군에서 약 37.5% 정도 회복되지 못했다. 반면에, 정상군 대비 INDO군은 31.5%, VI군은 22.7%가 회복되지 못했음을 나타내어, VIE 처치에 의해 뒷다리 체중 부하가 개선되어 통증이 빨리 호전되는 것으로 보여, 약물에 의한 약간의 체중 증가는 관절에 미치는 영향이 덜한 것으로 판단된다 (Figure 7B). 또한, 혈청 내 염증성 사이토카인은 MIA 투여로 정상군 대비 유의하게 증가하였으나 약물군에서는 유의하게 감소하였다 (Figure 8A). 특히, IL-1 β 이 INDO군 대비 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, VIE의 처치는 관절 조직 내 증가된 MDA를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 8B). 이러한 결과들은 VIE의 투여로 골관절염이 완화되었음을 시사한다.

한국에서 최근 다양한 연령대에서 대사증후군의 유병률이 꾸준히 증가하고 있으며²⁷⁾, 이는 비만 인구의 증가와 밀접한 연관이 있다. 비만은 만성적인 낮은 수준의 염증 상태를 의미하며, 산화적 스트레스의 감소를 위한 항산화 물질, 염증을 완화시켜주는 항염증 물질 및 지방 분해나 지방 축적을 조절하는 물질 등의 처치에 의해 효과적으로 개선이 된다고 보고되어 있다²⁸⁾. 따라서, VIE의 효과에 대해 전반적으로 평가하였을 시, 다양한 생리 활성을 지니고 있어 대사증후군의 예방 및 치료에 효과적일 것으로 판단되어진다.

하지만 본 연구는 VIE의 다양한 생리 활성을 탐구하기 위한이었기에 관련 효과에 대한 깊이 있는 기전 연구를 진행하지 못하였다. 본 연구에서 나타난 항비만 및 항염증 효과에 대한 기저 기전 연구 및 추가적인 동물실험이 진행되어 과학적인 증거 기반을 마련해야 할 것으로 판단되어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 *Veronica incana*의 다양한 생리 활성을 탐구하기 위해 in vitro, ex vivo 및 in vivo 실험을 수행하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. VIE로 in vitro 항산화 활성을 측정할 결과, 높은 TP와 TF를 함유하고 있었으며, DPPH와 ABTS radical 소거능에서 우수한 억제 효과를 보였다.
2. VIE로 ex vivo glycerol release를 분석한 결과, glycerol 배출이 Normal 대비 유의하게 증가함으로 인해 효과적인 지방분해 효과를 나타냈다.

3. In vitro RAW 264.7 세포 실험을 한 결과, VIE 처치는 LPS로 유도한 염증에서 NO 생성을 효과적으로 억제시켰다.
4. In vitro U2OS 세포 실험을 한 결과, VIE 처치는 미토콘드리아의 ROS를 유의하게 억제하였으며, 미토콘드리아의 막전위 변화를 효과적으로 개선했다.
5. In vitro 3T3-L1 세포 실험을 한 결과, VIE 200 μ g/mL 처치에 의해 지질 축적이 16.96% 유의하게 감소하였다.
6. VIE로 in vivo 골관절염 동물실험을 한 결과, VIE 처치는 뒷다리 체중 부하를 개선하여 통증의 빠른 회복 및 혈청 내 염증성 사이토카인 중 IL-1 β 을 두드러지게 억제하여 골관절염을 완화시켰다.

따라서 *Veronica incana*의 다양한 생리 활성을 평가한 결과, *Veronica incana*는 산화 스트레스를 억제하고, 항비만 및 항염증 효과를 지니는 특성을 확인하였다. 이러한 특성들은 추후 기능성 식품으로 개발될 때, 대사성 질환의 예방 및 치료에 유용한 잠재적 후보 소재로 간주될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 성과물은 정부 (과학기술정보통신부, No.2018R1A5A2 025272; 교육부, 2021R1I1A1A01059605)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med. 2006;27(1):1-93. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.008.
2. Ngo LT, Okogun JI, Folk WR. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. Nat Prod Rep. 2013;30(4):584-92. doi: 10.1039/c3np20120a.
3. López-González N, Mayland-Quellhorst E, Pinto-Carrasco D, Martínez-Ortega MM. Characterization of 12 polymorphic SSR markers in Veronica subsect. Pentasepalae (Plantaginaceae) and cross-amplification in 10 other subgenera. Appl Plant Sci. 2015;3(10):apps.1500059. doi: 10.3732/apps.1500059.
4. Salehi B, Shivaprasad Shetty M, V Anil Kumar N, Živković J, Calina D, Oana Docea A, Emamzadeh-Yazdi S, Sibel Kiliç C, Golosvili T, Nicola S,

- Pignata G, Sharopov F, Del Mar Contreras M, Cho WC, Martins N, Sharifi-Rad J. Veronica Plants—Drifting from Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology. *Molecules*. 2019; 24(13):2454. doi: 10.3390/molecules24132454.
5. Gründemann C, Garcia-Käufer M, Sauer B, Stangenberg E, Könczöl M, Merfort I, Zehl M, Huber R. Traditionally used *Veronica officinalis* inhibits proinflammatory mediators via the NF- κ B signalling pathway in a human lung cell line. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(1):118–26. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.039.
 6. Kim B, Lee KY, Park B. Minecoside promotes apoptotic progression through STAT3 inactivation in breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2022;23(3):94. doi: 10.3892/ol.2022.13214.
 7. Dunkić V, Kosalec I, Kosir IJ, Potocnik T, Cerenak A, Koncic MZ, Vitali D, Muller ID, Koprivanec M, Bezic N, Srecec S, Kremer D. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Veronica spicata* L. (Plantaginaceae). *Curr Drug Targets*. 2015;16(14):1660–70. doi: 10.2174/1389450116666150531161820.
 8. Kwak JH, Kim HJ, Lee KH, Kang SC, Zee OP. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina*. *Arch Pharm Res*. 2009;32(2):207–13. doi: 10.1007/s12272-009-1137-x.
 9. Kúpeli E, Harput US, Varel M, Yesilada E, Saracoglu I. Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. *J Ethnopharmacol*. 2005;102(2):170–6. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.042.
 10. Müller K, Albach DC. Evolutionary rates in *Veronica* L. (Plantaginaceae): disentangling the influence of life history and breeding system. *J Mol Evol*. 2010; 70(1):44–56. doi: 10.1007/s00239-009-9307-5.
 11. Park SM, Lee SH, Jeong DU, Cho SJ, Shin MR, Park HJ, Rho SS. Antioxidant Effect of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi in DSS-induced Ulcerative Colitis Model. *Kor J Herbol*. 2022;37(1):19–29. doi: 10.6116/KJH.2022.37.1.19.
 12. Kim GW, Woo CH, Kim YJ, An HD. Anti-oxidation and Fat Accumulation Inhibitory Effects of *Silbisan*. *JKMR*. 2020;30(4):41–53. doi: 10.18325/jkmr.2020.30.4.41.
 13. Shin MR, Lee JA, Kim MJ, Park HJ, Park BW, Seo SB, Roh SS. Protective Effects of *Phellinus linteus* Mycelium on the Development of Osteoarthritis after Monosodium Iodoacetate Injection. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:7240858. doi: 10.1155/2020/7240858.
 14. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271–8. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
 15. Rosenbloom RA, Chaudhary J, Castro-Eschenbach D. Traditional botanical medicine: an introduction. *Am J Ther*. 2011;18(2):158–61. doi: 10.1097/MJT.0b013e31820e80df.
 16. Sen T, Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;147:59–110. doi: 10.1007/10_2014_273.
 17. Xue H, Chen KX, Zhang LQ, Li YM. Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*. *Am J Chin Med*. 2019;47(6):1193–221. doi: 10.1142/S0192415X19500617.
 18. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013;51:15–25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
 19. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 25;22(7):3380. doi: 10.3390/ijms22073380.
 20. An HY, Rho SS, Shin MR. The Anti-Obesity Activity of *Syzygium aromaticum* L. in High-Fat Diet-induced Obese Mice. *Kor J Herbol*. 2024;39(1):11–21. doi: 10.6116/kjh.2024.39.1.11.
 21. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol*. 2006;329(8):598–607;discussion 653–5. doi: 10.1016/j.crv.2005.10.008.
 22. Min JY, Park YK. Effect of *Dipsaci Radix* Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages. *Kor J Herbol*. 2009;24(4):189–95. doi: 10.6116/kjh.2009.24.4.189.
 23. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z, Li YR. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;2(5):361–70. doi: 10.20455/ros.2016.865.
 24. Clutton G, Mollan K, Hudgens M, Goonetilleke N. A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker® Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry. *Cytometry A*. 2019;95(4):450–56. doi: 10.1002/cyto.a.23705.
 25. Katz LS, Geras-Raaka E, Gershengorn MC. Heritability of fat accumulation in white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(3):

- E335-44. doi: 10.1152/ajpendo.00075.2014.
26. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020;104(2):293-311. doi: 10.1016/j.mcna.2019.10.007.
 27. Atukorala I, Hunter DJ. A review of quality-of-life in elderly osteoarthritis. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2023;23(4):365-81. doi: 10.1080/14737167.2023.2181791.
 28. Kim MJ, Lee JA, Shin MR, Park HJ, Roh SS. Improvement Effect of Corni Fructus 30% Ethanol Extract by MIA-Induced Osteoarthritis Animal Model. *Kor J Herbol.* 2020;35(1):35-44. doi:10.6116/kjh.2020.35.1.35.
 29. Im HJ, Kim EJ. Determining prevalence of metabolic syndrome among Korean adults using complex samples analysis. *KSME.* 2017;19(3):85-97. doi: 10.21797/ksme.2017.19.3.007
 30. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127(1):1-4. doi: 10.1172/JCI92035.