

토끼의 관절병증에 미치는 알긴산올리고당의 치료효과

배영훈*, 안태훈, 임성철, 박석천¹, 이재창², 강남현³, 배춘식⁴

조선대학교 의과대학, 해밀튼 한의과대학¹, 나주대학 환경학과²,

K-1 바이오텍³, 전남대학교 수의과대학⁴

(게재승인 : 2002년 4월 30일)

Effect of Alginic Acid on Experimentally Induced Arthropathy in Rabbit Model

Young-Hoon Bai*, Tae-Hun An, Sung-Chul Lim, Sok-Cheon Pak¹, Jae-Chang Lee², Nam-Hyun Kang³, Chun-Sik Bae⁴

Chosun University Medical School

¹Hamilton College of Oriental Medicine,

²Environmental Department, Naju College, ³K-1 Biotech,

⁴College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Accepted : April 30, 2002)

Abstracts : For the induction of arthropathy, 5% hydrogen peroxide(H₂O₂) was injected for 5 weeks into the intraarticular space of the New Zealand white rabbits to damage articular cartilage. Alginic acid of low molecular weight (2%) made from macromolecular alginate treated with enzyme was administered into articular space at the dose of 5 mg/kg twice a week for 3 and 6 weeks using 1 ml syringe and 26 G needle. Saline was injected for the control. Tissues surrounding the articulation were obtained for the measurements of superoxide dismutase(SOD) activity as a major antioxidant enzyme and malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation level. Histopathologic examination on the surface of articular cartilage was carried out. Data showed that injection of hydrogen peroxide for 5 weeks had led to the induction of free radical damage and of articular cartilage change as confirmed by microscopic observation. The application of hydrogen peroxide caused a gradual increase in the SODs and MDA. These patterns were similar after 3 and 6 weeks of alginate treatment. Furthermore, microscopic examinations revealed that hydrogen peroxide caused flaking, fibrillation, fissuring, denudation, and hypocellularity in the articular surfaces. In conclusion, lipid peroxidation was demonstrated in the articular cartilage by the administration of hydrogen peroxide in the rabbit model. This lipid peroxidation could be caused by oxygen free radicals. The histologic and enzymatic correlations on lipid peroxidation in the articulation have provided a better understanding of arthropathy. It is possible to take advantage of these findings to evaluate effective alginate dosage more efficiently.

Key words : Arthropathy, alginic acid, superoxide dismutase activity, lipid peroxidation

서 론

관절병증(arthropathy)은 과거에 퇴행성 관절질환 또는 비대성 관절염이라고 일컬어지는 관절질환으로 활막관절에서 흔히 발생하는 병변이다. 이에 대한 병인은 아직

까지 불확실하다¹. 이 질환은 주로 관절의 연골이 약해지고 변형이 와서 관절표면과 그 주위에 비정상적으로 뼈가 형성되고² 뼈와 뼈의 접합 부분 관절연골이 마모되거나 손상되어 고통과 이차적 염증을 수반하는 것을 특징으로 하는 국소성 퇴행성 변화로서 비전신성 질환이

* Corresponding author : Dr. Young-Hoon Bai, Research Division of Biological Science, Chosun University Medical School, Gwangju 501-759, Korea

다³. 퇴행성 변화는 주로 무게를 지탱하는 관절의 연골 대사장애로 인한 것으로 보고 있으며^{4,5} 근래에 본 질환의 병인에 대해 많은 관심이 모아지면서 점차 많은 연구가 진행되고 있다.

관절병증에 대한 연구를 위하여 개, 토끼, 쥐, 양 등 다양한 동물에서 관절병증을 유발시키는 방법이 개발되어 왔다^{1,6-8}. 관절병증의 유발에는 석고나 부목 또는 철사를 이용하여 다리를 고정시키는 방법⁶, 관절낭에 papain을 주입하는 방법⁹, 앞쪽 십자인대를 절제하는 방법⁷, 관절강 내에 estradiol benzoate로 유발하는 방법¹⁰, 관절강 내에 collagenase를 주입하는 방법¹¹ 등이 이용되고 있는데, 본 연구에서는 토끼의 관절강 내에 과산화수소(H_2O_2)를 주입하여 인위적으로 관절병증을 유발하고자 하였다¹². 실험적으로 유발되는 관절 연골의 파괴는 연골조직의 육안적 탈락이나 조직의 물리적인 파괴 없이 기질 분자나 연골세포만이 감소하는 경우가 있고, 연골에만 국한된 연골조직의 물리적 파괴, 그리고 연골하골까지 이환하는 연골조직의 물리적인 파괴 등 크게 세 종류로 나눌 수 있는데 이러한 소견은 각기 퇴행성 관절염의 초기, 중기 및 말기의 소견과 유사한 점을 가진다.

관절병증은 관절 연골의 퇴행성 변화에 의해 발생하는 것으로 이를 완치시킬 수 있는 치료방법이 아직 개발되지 않은 상태이며 다만 류마티스 관절염과는 달리 염증성 변화 없이 연골의 소실과 관절의 변형이 초래되는 것이므로 관절병증의 치료는 연골의 변성이 더 진행되지 않도록 원인적 요인을 최대한으로 억제함으로써 관절의 통증을 완화시키고 기능을 회복시키는데 목표를 두고 있다. 또한 최근 관절병증을 치료하기 위한 방법은 다양하게 접근되고 있으나, 치료에 관해서는 비스테로이드성 약품과 스테로이드 계통의 약품, 그리고 면역억제제 등 모두 부작용이 초래되고 있는 실정이어서 치료법 개발이 시급한 상황이다.

본 연구에서는 토끼에 관절병증을 인위적으로 유발시킨 상태에서 항산화 효과가 있는 알긴산올리고당을 관절의 국소에 직접 주입하여 알긴산이 세포에 치명적인 손상을 유발하는 생체 내 라디칼을 제거하는데 중요한 방호기능을 발현하는지를 규명해 보았는데, 방법으로는 항산화 효소의 생화학적 기능과 광학현미경을 통하여 탐구하였다.

재료 및 방법

실험동물

대한실험동물센터에서 분양받은 수컷 New Zealand

white rabbit(2.0-2.5 kg)을 정상 대조군(n=7), 관절병증 유발 확인군(n=7) 및 관절병증에 미치는 알긴산올리고당의 효과를 살펴보기 위해 생리 식염수 투여군(이하 대조군)과 알긴산올리고당 투여군(이하 투여군)으로 나누고 각 군마다 각각 14마리씩 배정하여 총 42마리를 사용하였으며, 투여 기간이 경과된 토끼는 혈관에 공기를 주입시켜 도태시킨 후 관절의 육안 및 조직병리학적 관찰을 실시하였다. 또한 관절부위의 조직을 절제하여 항산화 효소 분석을 위한 시료로 이용하였다.

사육 및 실험기간 동안의 사육실 환경은 온도 $23 \pm 2^\circ C$, 상대습도 $50 \pm 5\%$ 를 유지하였고, 각각 분리된 철제 cage에서 토끼용 고행사료(푸리나 사료)와 식수를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

관절병증 유발

토끼의 관절병증은 26개이지 주사용 바늘을 이용하여 5% 과산화수소(H_2O_2) 0.5 ml을 매주 2번씩(월요일과 목요일) 5주 동안 토끼를 마취하지 않는 상태에서 좌측 관절강 내에 인위적으로 주입함으로써 유발하였다.

Alginate의 제조 및 투여

지금까지 알긴산올리고당의 저분자화는 주로 산과 알칼리를 이용하였으나 화학분해에 의해서 생산된 저분자 알긴산올리고당을 식품이나 의약품으로 사용시 발생할 수 있는 위험성을 예방하기 위해 생분해가 선호된다. 본 실험에서 사용된 저분자 알긴산올리고당은 Yutaka 등¹³의 방법을 수정하여 1% 알긴산올리고당 (10 mM Tris-HCl buffer)에 본 실험실에서 분리한 효소를 넣고 $50^\circ C$ 에서 20분간 반응시키면서 분해상태를 점검하여 적정상태가 되면 반응을 중지시킨다. 이때 얻어진 반응 상등액을 시료로 사용하였으며, 투여군은 2% 알긴산올리고당을 6주 동안 5 mg/kg의 농도로 투여하고 대조군은 생리 식염수를 동량 투여하였다.

사용시약

Bromophenol blue(3',3'',5'',5''-tetrabromophenolsulfonephthalein), Glycerol, HCl, Dithiothritol(DTT), Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), Potassium phosphate, Ammonium persulfate, Cytochrome C, Acrylamide, Glycine(aminoacetic acid), Tris(2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol), Hydrogen peroxide, n-butanol, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), Xanthine, Riboflavin, Sucrose Trizma-hydrochloride (tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride), Pyridine, Trizma base (tris[hydroxymethyl]aminomethane), Xanthine oxidase, Acetic acid, Bis-acrylamide (N,N'-

methylenebisacrylamide), Nitroblue tetrazolium(NBT), Bovine superoxide dismutase(BSOD), Hydrogen peroxide, Thiobarbituric acid, Sodium dodecyl sulfate(SDS), 1.1.3.3-tetramethoxy propane(YMP) 등의 시약을 Sigma사(St. Louis, MO, 6317, USA)로부터 구입하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 추출 및 활성도 측정

채취된 관절부위의 조직은 액체질소를 이용하여 균질화하였다. 균질된 시료에 0.1 mM EDTA와 50 mM phosphate buffer(pH 7.8)가 포함된 용액을 4 배량 첨가한 후 균질액으로부터 핵 분획을 제거하기 위해 4°C에서 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였으며, 원심분리된 균질액에서 상층액만을 다시 16,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 분리된 분획 중 상층액만을 조심스럽게 취한 후 순수분리를 위해 4°C에서 16,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 copper-zinc superoxide dismutase(CuZnSOD)를 추출하고, 이 초효소액을 단백질 분석에 이용하였다. 미토콘드리아에 분포하는 manganese superoxide dismutase(MnSOD)를 얻기 위해 전 단계에서 원심분리하여 얻은 pellet에 50 mM phosphate buffer(pH 7.8), 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA 용액 1 ml을 첨가하여 부유시킨 다음 4°C에서 22,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 다시 80,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 순수한 MnSOD를 얻었다. 단백질의 정량은 Bradford 방법을 이용하였으며, -70°C의 deep freezer에 보관, 실험에 이용하였다. SOD 활성도를 측정하기 위해 추출한 단백질을 McCord와 Fridovich¹⁴의 방법을 이용하였는데, xanthine oxidase에 의해서 xanthine이 uric acid로 전환될 때 생성되는 산소 라디칼이 cytochrome C를 환원하게 된다. 산소 라디칼은 SOD에 의해 제거되므로 환원되는 cytochrome C의 양은 감소하게 된다. 이 때 환원된 cytochrome C의 양으로 SOD 활성도를 측정한다. 실험방법은 0.1 mM EDTA, 50 mM potassium phosphate(pH 7.8)를 함유한 용액을 2.3 ml 첨가하고 0.1 mM cytochrome C 0.3 ml, 0.5 mM xanthine 0.3 ml, 0.05 mM KCN 용액을 순서대로 첨가하고 위 혼합물을 25°C 물중탕에 두며 xanthine oxidase 0.1 ml 첨가하여 혼합액과의 반응에서 흡광도의 증가가 파장 550 nm에서 0.02가 되도록 조절 한 후 추출된 단백질 0.01 ml을 첨가하고 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하여 SOD 활성도를 확인하였다.

Malondialdehyde(MDA) 측정

지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(MDA)는

Okawa 등¹⁵이 고안한 TBA(thiobarbituric acid) 방법으로 측정하였다. 채취한 토끼의 관절부위 조직의 무게를 잔 후 액체질소를 이용하여 균질화하였고 여기에 10배량의 1.15% KCl 용액을 첨가하여 최종 10% 균질액이 되도록 만든 후 균질액에서 0.1 ml만을 실험에 이용하였다. 10% 균질액에 SDS(8.1%) 0.2 ml, 20% acetic acid solution(pH 3.4) 1.5 ml, TBA(0.8%) 1.5 ml를 순서대로 첨가한 후 최종액이 4 ml가 되도록 멸균된 증류수 0.7 ml를 첨가하였다. 혼합액은 95°C 가온기에서 1시간 동안 가열한 다음 천천히 냉각시켰다. 냉각된 시료에 증류수 1 ml를 첨가하고 butanol-pyridine solution을 5 ml 넣은 후 흔들어 주었다. 원심분리기를 사용하여 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 다음 상층액 3 ml를 취하여 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 MDA 값을 확인하였다.

연골조직의 조직병리

토끼의 슬관절을 고정액에 24-48시간 고정시킨 후, 탈회액(De Cal Rapid[®], Patonal Diagnosis, Atlanta, USA)에 12시간정도 처리하여 탈회하였다. 24시간 동안 흐르는 물에 수세 후 저농도(70%)에서 고농도(100%)의 alcohol을 거쳐 탈수시키고, xylene으로 치환시킨 후 파라핀 블록으로 만들었다. 파라핀 블록은 microtome을 이용하여 3-4 μ m 두께로 절편하여, paraffin을 제거시킨 후 고농도의 alcohol에서 저농도 alcohol을 거쳐 함수시킨 후 증류수에 수세를 실시하였으며, hematoxylin-eosin염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

통계 처리

본 실험의 결과는 SAS 통계프로그램을 사용하여 Manova test에 의하여 각 실험군간의 통계학적 유의성을 검정하였으며, p-value의 값이 0.05 미만일 경우 유의한 수준으로 판정하였다.

결 과

MnSOD 활성도 분석

토끼 관절부위의 조직에서 MnSOD 활성도를 측정된 결과 Fig 1에서 보는 바와 같이, 정상 대조군의 11.91 ± 1.6 에 비해 관절병증 유발군은 42.9 ± 2.3 으로 MnSOD 활성도가 유의하게 증가되었다. 또한, 투여군은 대조군에 비해 MnSOD 활성도를 증가시키는 양상이 뚜렷했으며 이러한 경향은 치료기간에 비례하여 3주와 6주에 투여군과 대조군은 각각 45.6 ± 3.9 와 24.6 ± 4.6 및 48.5 ± 4.2

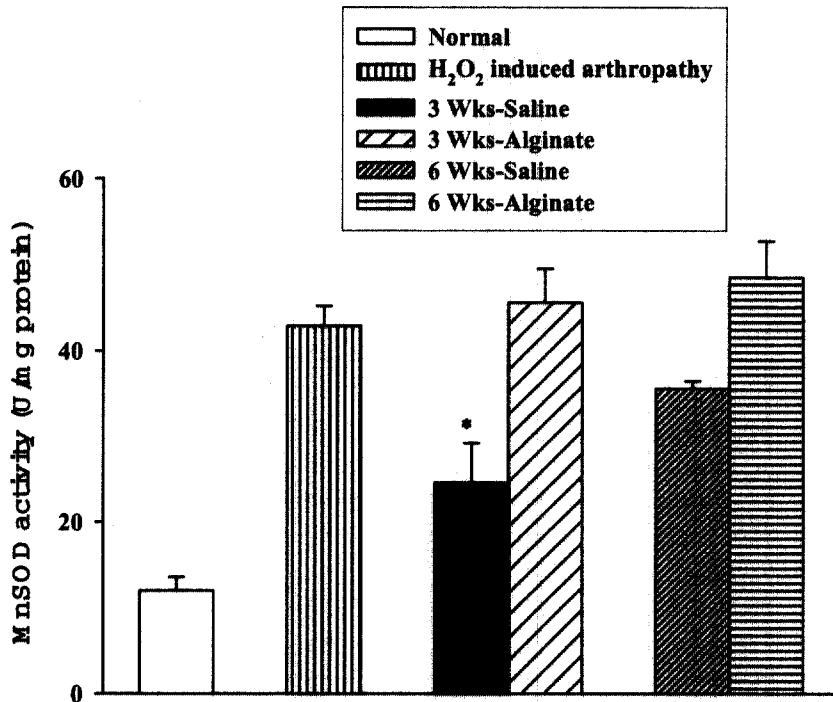


Fig 1. Comparison of MnSOD in the knee joint of rabbit after treatment with hydrogen peroxide(H₂O₂) and/or alginate. * p<0.05 against H₂O₂ induced arthropathy. Normal: 11.91 ± 1.6, H₂O₂ induced arthropathy: 42.9 ± 2.3, 3wks saline: 24.6 ± 4.6, 3wks alginate: 45.6 ± 3.9, 6wks saline: 35.6 ± 0.9, 6wks alginate: 48.5 ± 4.2

와 35.6 ± 0.9를 나타내었다. 이러한 결과로써 관절병증 유발군은 5% 과산화수소를 처치하였을 때 이로부터 발생하는 독성으로 인하여 MnSOD 활성이 증가하였고, 투여군에서도 MnSOD 발현은 증가한다는 사실을 알 수 있었다.

CuZnSOD 활성도 분석

관절부위의 조직에서 CuZnSOD 활성도를 측정된 결과 Fig 2에서 보는 바와 같이, 정상 대조군의 44.91 ± 9.5에 비해 관절병증 유발군의 CuZnSOD 활성도는 174.06 ± 14.6으로 유의하게 증가되었다. 투여군은 3주와 6주에 각각 122.7 ± 19.5와 74.25 ± 10.5를 나타내어 치료기간이 경과함에 따라 6주군이 3주군에 비해 훨씬 활성도가 감소하였으며 대조군의 3주와 6주의 각 측정결과 48.59 ± 14.6, 48.23 ± 3.9와 비교했을 때에도 높은 CuZnSOD 활성도를 나타내었다. 그 결과 관절병증 유발군은 5% 과산화수소 처치로 인한 라디칼 생성으로 인한 영향으로 증가양상을 보였으며, 투여군도 CuZnSOD 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다.

MDA 함량 분석

관절부위의 조직에서 발생하는 세포막의 손상 정도를 이해하기 위하여 지질과산화의 최종산물인 MDA 활성도를 측정된 결과 Fig 3에서 보는 바와 같이, 정상 대조군의 80.49 ± 5.6에 비해 관절병증 유발군은 174.7 ± 6.8로 유의하게 증가하여 세포막 손상의 심각성을 말해주었다. 투여군과 대조군은 3주와 6주에 각각 98.25 ± 9.8과 125.6 ± 12.6 및 85.5 ± 5.3과 134.89 ± 16.9를 나타내어 투여군은 치료기간이 길어짐에 따라 MDA 활성도가 감소되었다. 이 결과로 세포막의 손상정도가 알긴산올리고당의 치료기간에 따라 차이가 있었음을 알 수 있었다.

조직병리학적 관찰

과산화수소가 투여되지 않은 정상 대조군의 femur cartilage는 tangential, transitional, radiate, mineralized zone으로 확연히 구분되었으며 radiate zone과 mineralized zone은 단일선의 tidemark로 구분되었다. 관절면과 평행하게 배열되어 있는 tangential zone 내의 세포들은 난원형 또는 elongate형을 하고 있었으며, transitional zone 내의

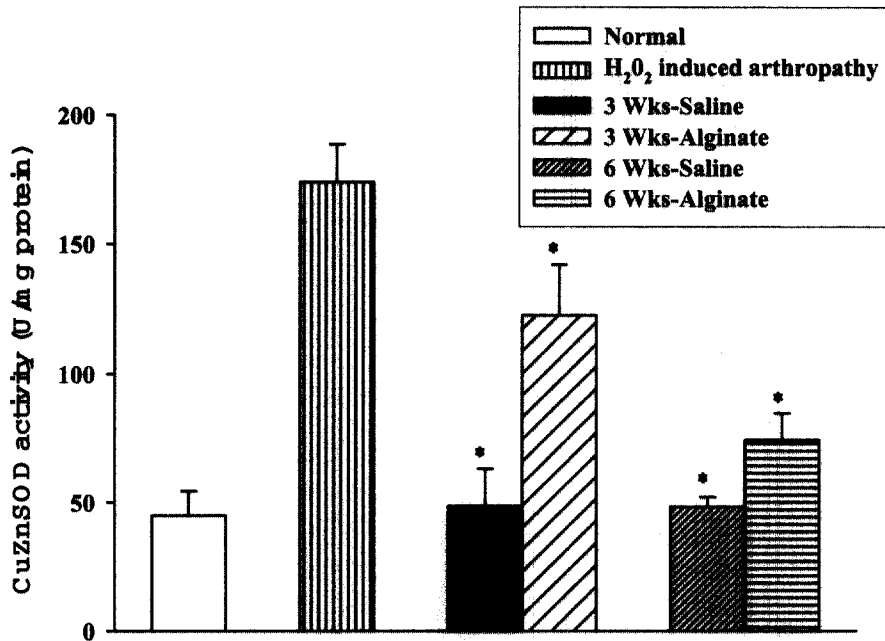


Fig 2. Comparison of CuZnSOD in the knee joint of rabbit after treatment with hydrogen peroxide(H₂O₂) and/or alginate. * p<0.05 against H₂O₂ induced arthropathy. Normal: 44.91±9.5, H₂O₂ induced arthropathy: 174.06±14.6, 3wks saline: 48.59±14.6, 3wks alginate: 122.7±19.5, 6wks saline: 48.23±3.9, 6wks alginate: 74.25±10.5

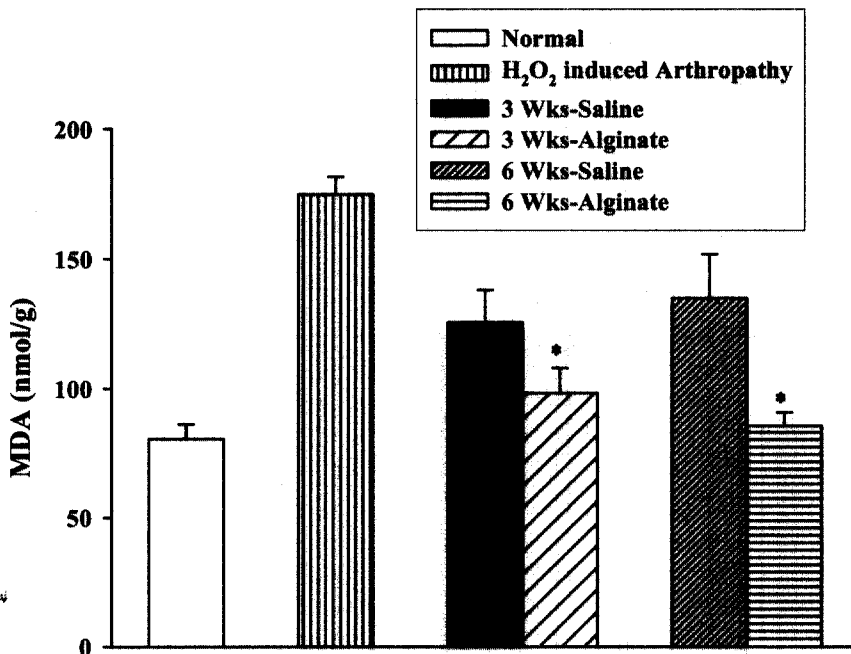


Fig 3. Hydrogen peroxide(H₂O₂) induced a significant increase of lipid peroxidation in the knee joint of rabbit. * p<0.05 against H₂O₂ induced arthropathy. Normal: 80.49±5.6, H₂O₂ induced arthropathy: 174.7±6.8, 3wks saline: 125.6±12.5, 3wks alginate: 98.25±9.8, 6wks saline: 134.89±16.9, 6wks alginate: 85.5±5.3

세포들은 소형으로 난원형 또는 구형의 모양을 띄고 있었다. 이에 반해 radiate zone 내의 세포들은 대형의 구형 세포들로 column 형태를 이루면서 증식하고 있었으며, mineralized zone은 subarticular bone과 곧바로 연결되어 있었다(Fig 4). 과산화수소가 투여된 관절병증 유발군은 관절연골의 연화와 연골세포군 사이의 분열인 fibrillation이 두드러지게 나타났으며 tangential zone의 cleft, swelling과 더불어 연골의 소실이 transitional zone으로까지 이어졌다(Fig 5a). 또한 심한 경우는 연골 전층의 심한 파괴와 이에 수반된 관절면의 섬유화를 동반한 변성소견이 관찰되고, 연골하 골조직 손상까지 초래되는 변화를 보였다. 정상에서 단일선이었던 tidemark가 multilayer를 형성하고 있었다(Fig 5b). 알긴산올리고당을 3주 동안 투여한 토끼의 관절면에서는 여전히 fibrillation이 관찰되었으며 radiate zone에서의 연골세포의 과사가 간혹 관찰되고 hypocellularity를 특징으로 하였다(Fig 6). 6주 동안 알긴산올리고당을 투여한 토끼는 hypercellularity로 인해 각 zone에서의 연골세포가 상당히 양호하게 회복되었다(Fig 7). saline을 3주 동안 투여한 토끼의 관절면에서는 관절면의 fibrillation, undulation이 관찰되고, radiate zone의 소실, tidemark의 불규칙성과 multilayering, 연골하 골조직 손상 소견이 여전히 있었다(Fig 8). saline을 6주 동안 투여한 경우 세포충실도는 많이 회복되었으나, 일부 관절면의 부종이 관찰되고, radiate zone의 형성이 미흡하고, 관절연골 전체의 구성이 제대로 형성되지 못하였다(Fig 9).

고 찰

관절병증은 주로 관절의 연골 대사장애로 인해 연골의 주요 구성물질인 proteoglycan의 합성 감소와 collagen fibrils의 분해에 의해 특성화되어진 질병이다. 질병구조와 조직병리화적인 변화에 의하여 인간의 osteoarthritis와 비슷하며, 다양한 실험적인 관절병증 모델들이 보고되어 연구가 활발히 진행되고 있다.

관절병증에 대한 연구를 위해 다양한 동물에서 관절병증을 유발시키는 방법이 개발되어 왔으며, 관절병증 실험모델은 그 병리현상에 대한 예방 및 치료를 포함한 여러 연구를 목적으로 활발히 추진되어 왔다. 이러한 관절병증 모델이 실제 치료제의 효과 검증 등에 사용되기 위해서는 그 기전과 병리학적 변화가 사람의 관절병증과 유사해야 하며, 초기 병변의 진행이 비교적 서서히 일어나야 한다⁸. Kaiki 등¹²은 5% H₂O₂를 관절낭에 주입하여 관절연골을 불안정하게 함으로써 관절병증을 유발하였다. 이렇게 만들어진 관절병증 모델은 관절면의 변

화에 있어서 사람의 osteoarthritis와 유사하여 많은 연구에 사용되었고, 이 방법에 의해 제작된 토끼 관절병증 모델은 관절이 개에 비해 사람과 더 유사하기 때문에 관절변성의 평가에 보다 적합한 모델이라 생각된다. 질병의 초기 변화로서 관절연골의 변성을 야기시키는 기전은 아직까지 분명하게 밝혀지지 않고 있으나, 활액의 hyaluronic acid가 시합관내에서 효소적으로 생성된 유리기에 의해서 손상되고, 활액의 점도는 유리기나 과산화수소 및 철 이온 등에 의해서 감소되며, 관절병증 환자에서 활액에 증가된 백혈구가 유리산소의 생성을 증가시키고, 또한 유리기에 의한 지질 과산화산물인 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 양이 증가되는 것 등으로 미루어 관절병증과 유리기는 밀접한 연관이 있는 것으로 추측된다¹⁶.

관절병증은 Haber-Weiss반응으로 다당류의 탈중합화에 의해 야기되며, 기질에 superoxide radical이 발생하는 근원은 다형핵백혈구가 관여하여 일어난다¹². 또 관절연골손상은 활성산소, prostaglandin생성, protease의 변화와 arachidonic acid로 인해 발생된다고 보고되었다¹⁷. 그리하여 본 연구에서 관찰된 연골의 fibrillation으로 인해 관절면이 평활함과 윤택을 잃게 되고 간유리처럼 변하며 표면은 velvet처럼 변하게 된다. 이때 증가되는 지질과산화 양상은 토끼의 관절병증 유발실험에서 연골 변성의 초기 단계라고 할 수 있다.

본 연구에서는 고분자형태의 알긴산올리고당을 독특한 효소의 기법에 의해 저분자로 만들어 관절병증이 유발된 토끼의 관절강내에 직접 국소 주입함으로써 연골의 변성을 억제하여 관절병증과 같은 관절질환의 치료에 응용될 수 있는 가능성을 탐구하였다. 또한 관절병증의 관절연골내 수분의 증가와 glycosaminoglycan의 부족으로 생기는 연골 연화, SOD 활성도 감소, 지질과산화증가 등으로 나타나는 항산화효소의 활성이 관절병증의 발생에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측되나 항산화효소 활성도 변화에 따른 관절손상에 미치는 영향에 대한 보고는 아직 없어 그에 따른 효과를 검증코자 하였다. 토끼의 관절강내에 관절연골을 손상시킬 목적으로 과산화수소를 주입하여 관절병증을 유발시켜 항산화 효과가 있다고 알려진 알긴산올리고당을 처치하여 치료효과를 알아본 결과 MnSOD나 CuZnSOD는 정상 대조군에 비해 관절병증 유발군에서 증가하여 산소라디칼에 의한 독성을 방어하는 작용으로 SOD의 활성을 증가시키지 않았나 생각된다. 지질과산화의 최종산물인 MDA를 측정된 결과 또한 관절병증 유발군에서 현격한 증가를 보였지만 알긴산올리고당에 의한 치료효과는 눈에 띄게 나타났다. 이는 연골세포의 파괴가 억제되고 있음을 보이는

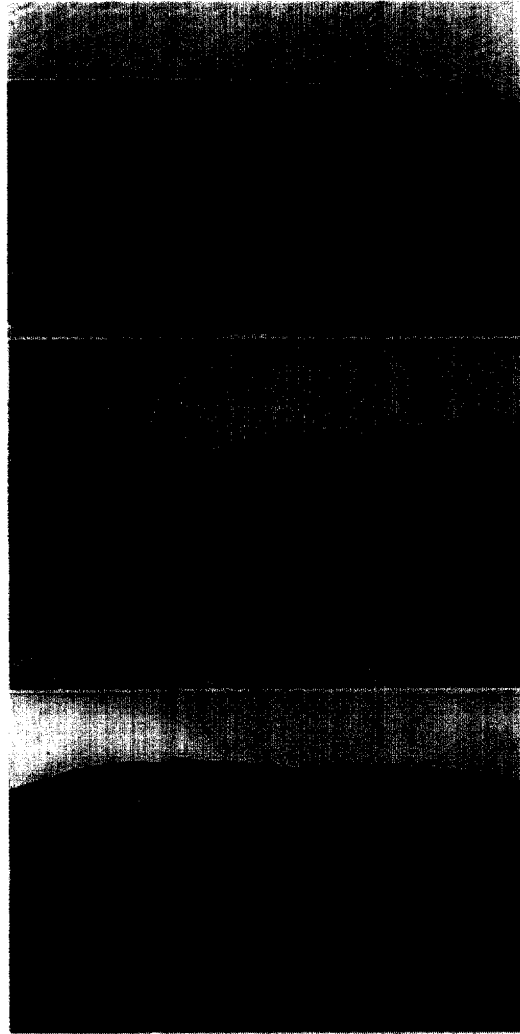


Fig 4. Normal cartilage shows hypercellularity and smooth surface with the longitudinal arrangement of cartilage cells. H&E stain $\times 200$.

Fig 5. Hydrogen peroxide-induced osteoarthropathy group. a; Articular surface shows fissuring, flaking and fibrillation (arrows). Upper half of the articular cartilage (asterisks) is degenerated. b; Full thickness of the articular cartilage is damaged and is replaced by degenerated connective tissue (asterisks). H&E stain $\times 200$.

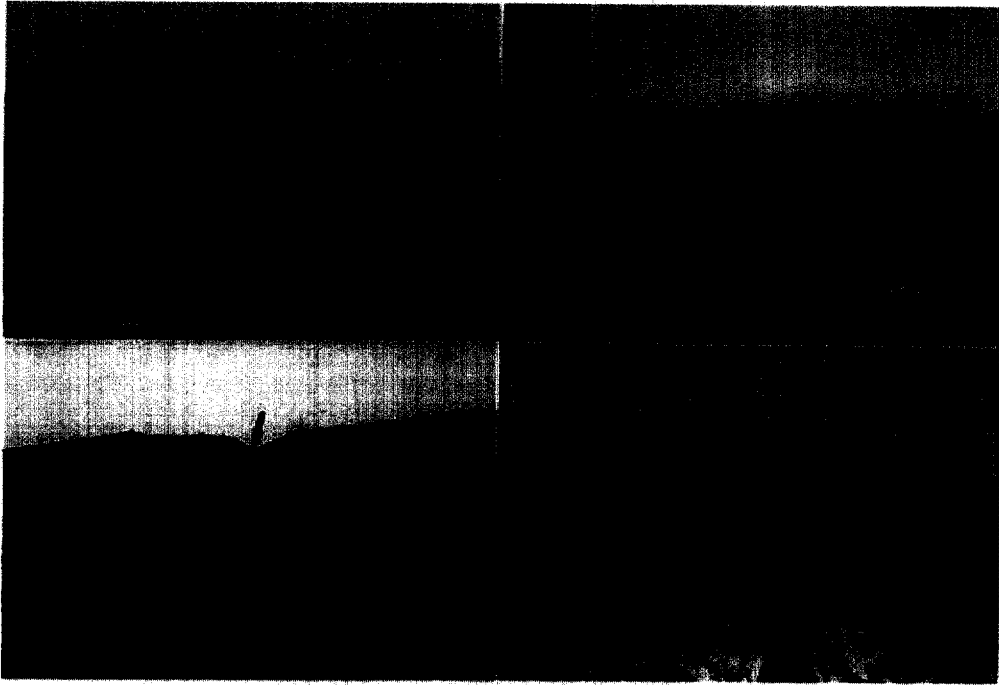


Fig 6. Alginate-treated osteoarthropathy group (3 weeks). The articular surface is irregular having several flakings (arrows). Thinning of the articular cartilage with disorganized arrangement of chondrocytes. H&E stain $\times 200$.

Fig 7. Alginate-treated osteoarthropathy group (6 weeks). Relatively smooth articular surface with hypercellularity can be seen. Organization of the chondrocytes is more improved than that of the 3 weeks. H&E stain $\times 200$.

Fig 8. Saline-treated osteoarthropathy group (3 weeks). Indented articular surface (arrow) and thinning, unorganization and hypocellularity of articular cartilage is noted. H&E stain $\times 200$.

Fig 9. Saline-treated osteoarthropathy group (6 weeks). Edematous change of articular surface (arrows) is noted. However, the overall features including organization, cellularity and thickness of articular cartilage are more improved than those of the 3 weeks. H&E stain $\times 200$.

것으로 알긴산 올리고당이 항산화제 기능으로서 작용하는 것으로 추정된다. 본 실험을 통하여 유발된 관절병증의 주요 광학현미경 소견은 연골표면의 불규칙과 갈라진 틈, 연골세포의 괴사, 연골세포 수와 크기 변화가 특징적으로 보였으며, 관절연골 세포들의 변성 및 괴사, 갈라진 틈이 심층부까지 침범하여 교원섬유가 파열되었음을 확인 할 수 있었다. 연골세포의 증생은 조직학적으로 cell clusters의 출현으로 알 수 있으며, 관절병증이 유발된 연골표면에 알긴산올리고당을 주입함으로써 연골 표면과 연골세포의 크기가 대조군에 가깝게 변화되고 있는 상태였고 알긴산올리고당은 생물학적인 어떤 기전과 프리라디칼을 소거하는 역할에 관여한다고 사료된다. 이러한 결과는 지질과산화 정도와 일치되는 것으로 나타났으며 tangential zone의 괴사된 연골세포가 확실히 줄어들었으며 이런 점으로 미루어 보아 알긴산올리고당의 역할은 항산화제의 기능에 있어 hydroxyl radical을 방어하는 효과 뿐 아니라 pro-oxidant의 기능이 있는 것으로 사료되었다.

결 론

토끼에 관절병증을 인위적으로 유발시키고 항산화 효

과가 있는 알긴산올리고당을 관절의 국소에 직접 주입하여 알긴산올리고당이 세포에 치명적인 손상을 유발하는 생체 내 라디칼을 제거하는데 중요한 방호기능을 발현하는지를 알아보기 위하여 항산화 효소의 생화학적 기능과 조직의 광학현미경 관찰을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

관절부위의 조직에서 MnSOD와 CuZnSOD 활성도를 측정된 결과 관절병증 유발군은 5% 과산화수소를 처치하였을 때 이로부터 발생하는 독성으로 인하여 MnSOD와 CuZnSOD 활성이 증가하였고, 알긴산올리고당 투여군도 MnSOD와 CuZnSOD 활성이 증가하였으나, 관절부위의 조직에서 MDA의 활성도를 측정된 결과 알긴산올리고당 투여군은 saline 투여군에 비해 MDA가 유의하게 감소되는 것으로 보아 알긴산올리고당이 직접적으로 항산화제로서의 작용을 하든지, 간접적으로 MnSOD나 CuZnSOD의 활성화 유도를 통하여, 또는 어떠한 생물학적 작용을 통하여 항산화작용을 하는 것으로 사료된다. 그리고, 알긴산올리고당은 그 치료기간이 길어짐에 따라 MDA 활성도가 감소되어 세포막의 손상정도가 알긴산올리고당의 치료기간이 길어짐에 따라 감소됨을 알 수 있었다. 조직학적 관찰 결과로서도 이를 뒷받침하는데, 알긴산올리고당을 3주 동안 투여한 토끼의 관절면

Table 1. Histopathologic findings of each group

Micro-findings	No treatment	H ₂ O ₂ induced OA	Alginate treatment		Saline treatment	
			3 wks	6 wks	3 wks	6 wks
articular surface	smooth	fissuring, flaking, fibrillation	irregular with some flakings	relatively smooth	indented	relatively smooth, occasionally edematous
articular cartilage	well organized	damaged and replaced by degenerated CT/thinned	disorganized, thinned	more improved organization and thickness	unorganized, thinned	improved organization and thickness
degeneration of cartilage	absent	present in upper half	present in upper 1/4	occasionally present in upper 1/4	occasionally present in upper half	occasionally present in upper 1/3
tidemark	relatively straight, monolayered	loss or irregular/multilayered	irregular/multilayered	irregular/multilayered	irregular/multilayered	irregular/multilayered
subarticular bone	well preserved	damaged	regenerating	more regenerated	regenerating	more regenerated
cellularity	hypercellular	hypocellular	hypocellular	more improved cellularity	hypocellular	improved cellularity

OA; osteoarthopathy, CT; connective tissue

에서는 여전히 fibrillation이 관찰되었으며 radiate zone에서의 연골세포의 피사가 약간 눈에 띄었고 hypocellularity를 특징으로 하였으나 6주 동안 알긴산올리고당을 투여한 토끼는 hypercellularity로 인해 각 zone에서의 연골세포가 상당히 양호하게 회복되어 있었고, 이는 saline을 각각 3주, 6주 투여한 경우와 대조적인 결과였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 알긴산올리고당의 역할은 항산화제의 기능에 있어 hydroxyl radical을 방어하는 효과 뿐 아니라 pro-oxidant의 기능이 있어 관절염의 치료에 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2001년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

1. Abatangelo G, Botti P, Del Bue M, Gei G, Samson JC, Cortivo R, De Galateo A, Martelli M. Intraarticular sodium hyaluronate injection in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results. *Clin Orthop*, 241:278-285, 1989.
2. Mitrovic DR, Garcia F, Front P, Guillemet V. Histochemical and cellular changes induced in the rabbit knee joint by an intraarticular implantation of a sheet of polyethylene. *Lab Invest*, 53:228-239, 1985.
3. Minns, R. J. Steven, F. S. Hardinge, K. Osteoarthrotic articular cartilage lesions of the femoral head observed in the scanning electron microscope. *J Pathol*, 122:63-70, 1977.
4. Walker ER, Boyd RD, Wu DD, Lukoschek M, Burr DB, Radin EL. Morphologic and morphometric changes in synovial membrane associated with mechanically induced osteoarthrosis. *Arthritis Rheum*, 34:515-524, 1991.
5. van Valburg AA, van Roermond PM, Marijnissen AC, Wenting MJ, Verbout AJ, Lafeber FP, Bijlsma JW. Joint distraction in treatment of osteoarthritis (II): effects on cartilage in a canine model. *Osteoarthritis Cartilage*, 8:1-8, 2000.
6. Videman T, Eronen I, Candolin T. [³H]proline incorporation and hydroxyproline concentration in articular cartilage during the development of osteoarthritis caused by immobilization. A study in vivo with rabbits. *Biochem J*, 200:435-440, 1981.
7. Kim NH, Han CD, Lee HM, Yang IH. Effect of sodium hyaluronate on prevention of osteoarthritis. *Yonsei Med J*, 32:139-146, 1991.
8. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, Iwata H, Miura T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*, 298:296-304, 1994.
9. Bentley G. Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*, 53:324-337, 1971.
10. Tsai CL, Liu TK. Inhibition of estradiol-induced early osteoarthrotic changes by tamoxifen. *Life Sci*, 50:1943-1951, 1992.
11. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 6:177-186, 1998.
12. Kaiki G, Tsuji H, Yonezawa T, Sekido H, Takano T, Yamashita S, Hirano N, Sano A. Osteoarthrosis induced by intra-articular hydrogen peroxide injection and running load. *J Orthop Res*, 8:731-740, 1990.
13. Yutaka N, Sato T, Nishi Y, Takeuch T, Murata K, Kusakabe I. Purification and characterization of extracellular alginate lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. *Biosci Biotech Biochem*, 59:632-637, 1995.
14. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6049-6055, 1969.
15. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358, 1979.
16. Hutadilok N, Smith MM, Ghosh P. Effects of hydrogen peroxide on the metabolism of human rheumatoid and osteoarthrotic synovial fibroblasts in vitro. *Ann Rheum Dis*, 50:219-226, 1991.
17. Chrisman OD, Ladenbauer-Bellis IM, Panjabi M, Goeltz S. The relationship of mechanical trauma and the early biochemical reactions of osteoarthrotic cartilage. *Clin Orthop*, 161:275-284, 1981.