

## 골관절염 실험모델에서 꾸지뽕나무 추출물의 골관절염 억제효과 연구

남다은<sup>1</sup> · 김옥경<sup>1</sup> · 이정민<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 의학영양학과

<sup>2</sup>경희대학교 임상영양연구소

## Therapeutic Effects of *Curdrania tricuspidata* Leaf Extract on Osteoarthritis

Da-Eun Nam<sup>1</sup>, Ok Kyung Kim<sup>1</sup>, and Jeongmin Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

### Abstract

The inhibitory effect of ethanol extracts from *Curdrania tricuspidata* leaves (CTL) on osteoarthritis was investigated in primary cultured rat cartilage cells and a monosodium-iodoacetate (MIA)-induced arthritis rat model. To identify the effects of CTL 80% ethanol extracts (CTL80) and CTL 10% ethanol extracts (CTL10) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment *in vitro*, cell survival was measured by the MTT assay. Cell survival after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment increased with CTL80 and CTL10 close to normal up to 300 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The mRNA expression of matrix metalloproteinases (MMPs) was determined MMP-7 and MMP-13 (known catabolic factors), were significantly inhibited by CTL 80 and CTL10; a 200 µg/mL dose of CTL80 especially decreased MMP-13 expression. *In vivo*, osteoarthritis was induced by an intra-articular injection of MIA into the knee joints of rats, then CTL80 and CTL10 orally administered daily for 35 days. After the animals were sacrificed, histological evaluations of their knee joints revealed a reduction in polymorphonuclear cell infiltration and smooth synovial lining in the CTL80-500 group. Micro-CT analysis of hind paws from CTL80-500 and CTL10 showed a protection against osteophyte formation, soft tissue swelling, and bone resorption. In conclusion, CTL ethanol extracts are effective in ameliorating joint destruction and cartilage erosion in MIA-induced rats. CTL decreases and normalizes articular cartilage through preventing extracellular matrix degradation and chondrocyte injury, and could potentially serve as a therapeutic treatment for humans.

**Key words:** *Curdrania tricuspidata*, osteoarthritis, primary culture, chondrocytes, monosodium iodoacetate, MMPs

### 서 론

1998년과 2001년도 국민건강영양조사에 의하면 관절염은 45세 이상에서 흔한 만성질환이었으며 관절염의 유병률은 연령에 따라 증가하여 65세 이상 인구에서는 1998년 천명당 356.7명, 2001년 364.2명을 차지하였다(1). 최근 '2010년 고령자 통계'에 따르면 우리나라 65세 이상 노인인구 비율은 11%로서 인구구조의 고령화에 따라 만성퇴행성 질환 유병률 또한 증가하고 있고, 연간 유병률이 높은 만성질환으로서 관절염이 43.1% 이상 차지하고 있다(2). 관절염이란 관절에 일어난 염증으로 흔히 통증, 강직 및 부종이 동반되고 그 원인은 퇴행성 변화, 면역계 이상, 감염, 외상, 대사 장애 등이며 그 종류는 100여 가지가 넘는다(3). 그중 골관절염(osteoarthritis)과 류마티스(rheumatoid arthritis, RA) 관절염이 전체 관절염의 80%를 차지하고 있으며 근골격계 질환으로 인한 부담 중 가장 많은 부분을 차지한다. 골관절염의

발병과 관련된 인자들을 크게 분류해 보면 단백질 가수분해 효소(proteolytic enzymes), cytokines, 그리고 nitric oxide(NO)가 주요 인자들로 알려져 있다(4-7). 연골조직에서의 물질 대사 과정은 연골조직의 퇴화에 중추적인 역할을 하며(8), 대표적으로 matrix metalloproteinases(MMPs)는 골 및 연골의 기질 구성요소를 파괴하는 단백 분해효소로서 관절염 등의 병적인 상태에서도 발견되어 병인에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(9,10). 관절염 발병시 발현이 증가하는 MMPs로 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-7 그리고 MMP-13 등이 있으며, 특히 MMP-7과 MMP-13의 경우 골관절염에서 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다(11).

꾸지뽕나무(*Curdrania tricuspidata*)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 낙엽활엽교목으로 동아시아나 우리나라 전라도, 경상도, 충청남도 등에 분포하며 최근 꾸지뽕나무의 향산화(12), 항염(13), 항당뇨, 고혈압 억제(14) 등에 관한 연

\*Corresponding author. E-mail: jlee2007@khu.ac.kr  
Phone: 82-31-201-3779, Fax: 82-31-204-8119

구가 보고되었으며, 이러한 생리활성 작용은 꾸지뽕나무의 페놀성 화합물을 생리활성 성분에 기인하는 것으로 보이며 (15,16) 이에 따라 꾸지뽕나무의 기능성 입증에 관한 연구에 대해 관심이 증가하고 있다.

최근 들어 관절염에 대한 건강기능식품의 기호도 및 수요가 고령화 사회의 흐름에 부합하여 급격히 증가하고 있으며 대다수의 경우 glucosamine과 chondroitin이 시장성을 형성하고 있다(17,18). 하지만 일부 의학계에서 기능성식품으로서의 glucosamine 효과에 대한 의문점을 제기한 바 있고 향후 지속적인 관절염 건강기능식품의 시장을 유지 형성하고 골관절염 관련 기능성 소재의 개발을 위해서는 이를 대체할 방안이 필요하며 이러한 시점에서 꾸지뽕에 대한 관심이 증대되고 있다. 꾸지뽕나무를 민간에서는 예부터 그 줄기와 뿌리를 신경통과 간암 등에 달여 마신 점으로 보아, 골관절 질환에도 유의한 효과가 있을 것으로 사료되나 아직 이에 대한 실험적 연구는 미미한 실정이다.

이에 꾸지뽕나무의 관절 질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고 향후 기능성 식품 소재의 개발을 위한 가능성을 확인하고자, 세포 수준에서 꾸지뽕잎 추출물의 효과와 약물로 관절염을 유발한 rat에서 꾸지뽕잎 추출물 투여효과를 관찰하여 검증하기로 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

영농조합법인 고성꾸지뽕(강원도 고성군)에서 구입한 꾸지뽕나무의 잎 50 g에 1 L의 10% 에탄올, 80% 에탄올을 가하여 3시간 동안 250°C에서 환류(reflux)하여 추출을 수행하고, 얻어진 추출물을 여과지(Advantec filter paper 6, 150 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 여과액을 회전진공농축기(rotatory evaporator, N-1N, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 동결시킨 후 건조기(FD8512, ILshin Lab Co., Ltd., Seoul, Korea)로 건조시키고 분말화하였다.

### 연골세포의 분리 및 배양

연골 채취를 위한 실험동물은 4~6주령 무게 약 180~200 g 정도의 male Sprague-Dawley rat을 경추탈골 하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 관절연골을 2~3 mm 정도 크기로 채취하였고, 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮겼다. 0.1% EDTA-CDMF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액에 30분씩 2회 incubation 시키고(37°C, 5% CO<sub>2</sub>), 0.25% trypsin으로 1시간 incubation(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 하였다. 2 mg/mL collagenase type I(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 shaker에 120 rpm으로 12시간 동안 처리하였다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 100 µm pore size cell strainer(BD Falcon, Franklin Lakes,

NJ, USA)에 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(Hyclone Laboratories)으로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포는 10% FBS(Hyclone Laboratories)와 DMEM(Hyclone Laboratories)에 1% penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories)과 1% L-glutamine(Hyclone Laboratories), 그리고 0.1% gentamycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 75T flask에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양하였다. 이때 2~3일에 한번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대하였으며 세포의 passage는 5 이하로 사용하였다.

### Cell viability 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 96-well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 꾸지뽕 주정추출물을 농도별로 처리하여 24시간(독성시험) 또는 2시간(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 세포재생시험) 동안 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 20 µL 처리하여 최대 3시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 200 µL를 가하여 560 nm에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

### Real-time polymerase chain reaction에 의한 MMPs 발현 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 6-well plate에 5×10<sup>6</sup> cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 꾸지뽕잎 주정추출물을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 연골세포에 2시간 동안 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript™ Select cDNA Synthesis Kit(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하여 5 µg의 total RNA에 5× iScript select reaction mix를 4 µL, oligo(dT) primer set 2 µL(Table 1), RNA sample 5 µL, nuclease-free water 8 µL를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1 µL를 넣어 pipet 으로 up & down 하여 골고루 섞어주었다. 42°C에서 60분, 85°C에서 5분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 PCR 반응에 사용하였다. Real-time PCR 실험 시 사용한 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)이며 iQ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)의 protocol에 따라 수행하였다. PCR을 위한 혼합액 최종농도는 cDNA 2 µL(10~100 ng), 2× iQ SYBR Green Supermix 10 µL, forward & reverse primer 각 1 µL(250 nM), H<sub>2</sub>O 7 µL가 되도록 하였다. 95°C에서 10분간 hot start 한

Table 1. Primer set sequence used for real-time PCR

Sequence name	Forward sequence	Reverse sequence	NCBI reference
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1
MMP-13	ACG TTC AAG GAA TCC AGT CTC TCT	GGA TAG GGC TGG GTC ACA CTT	NM_133530.1
MMP-7	ACT CTA GGC CAT GCC TTT GC	CCA TCC GTC CAG TAC TCA TCC T	NM_012864.2

Table 2. Experimental design animals (n=4/group)

Groups	Induced arthritis	Dietary administration	Orally administration
Normal	-	AIN 93G diet	
Control	+	AIN 93G diet	
MTX	+	AIN 93G diet	Methotrexate 2 mg/kg
CTL10-200	+	AIN 93G diet	CTL10-200 mg/kg
CTL10-500	+	AIN 93G diet	CTL10-500 mg/kg
CTL80-200	+	AIN 93G diet	CTL80-200 mg/kg
CTL80-500	+	AIN 93G diet	CTL80-500 mg/kg

후 95°C에서 15초간, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초간 40 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다.

실험동물 및 군 분류

실험동물은 6주령의 male Sprague-Dawley(SD) rat (Daehanbiolink, Eumseong, Korea)을 군당 4마리씩 총 28마리를 cage에 각각 넣고 일주일 동안 순화시킨 뒤 사용하였다. 사육실의 온도는 25±2°C, 습도 55±10%로 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 하였고, 물과 고형사료는 자유롭게 공급하였다. 실험군 분류는 Table 2에 제시하였다.

식이 및 급여

꾸지뽕 잎 에탄올 추출물 투여에 따른 관절염 예방 효과를 관찰하기 위해 관절염 유발 2주일 전부터 1일 1회 경구투여를 실시하고, 유발 후 3주간 지속적으로 투여하고 관찰하였다. 독성실험을 통해 결정된 200 mg/kg, 500 mg/kg을 적정 농도로 하여 시료를 제조하였으며 양성대조군으로는 항관절염 효과가 있는 약물인 methotrexate(Sigma-Aldrich)를 사용하였다(19). Methotrexate 투여군은 존대를 이용하여 주 1회 일정시간에 2 mg/kg을 경구투여 하였으며 나머지 모든 실험군에서 시료를 증류수에 녹인 후 매일 일정시간 6주간 경구투여를 실시하였다. Methotrexate는 장기적인 투여 시 나타나는 독성과 투여기간 동안 약물의 반감기로 인해 효과가 감소할 것을 우려하여 주 1회 2 mg/kg으로 경구투여 하였고 식이는 3일에 한 번씩 교환하고, 이때 잔여무게(일부 cage 안으로 떨어진 것을 회수)를 측정하여 섭취량을 환산하였다. 물에 대한 접근은 임의대로 하였으며 음용량 양은 3일에 한 번씩 측정하고 새로운 물로 교환하였다.

관절염 모델

6주령의 male SD rat을 이용하며 Zoletil(cat. No. 06516,

Virbac, Carros, France)과 Rumpun(cat. No. 41882, Bayer Korea, Seoul, Korea)을 2:1 비율로 희석한 후에 복강주사로 마취시켰다. 마취시킨 rat의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA(Sigma-Aldrich)를 1 mL 주사기로 양쪽 무릎 관절강 내에 50 µL(60 mg/mL)씩 주사하였다. MIA 희석 시에는 saline 용액을 사용하고 약물 주사 7일 후에 관절 부위 부종정도와 실험동물의 걷는 상태를 관찰하여 관절염 유발 확인 후 실험을 진행하였다.

병리조직학적 평가를 위한 표본제작 및 염색

실험 종료 후 rat을 경추 탈골하여 병리조직학적 관찰을 위해 슬관절을 채취하였다. 슬관절의 고정을 위해 적출 즉시 10% formaldehyde(Junsei, Tokyo, Japan)로 24시간 고정하였고, Calci-Clear Rapid(National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)로 24시간 간격으로 72시간 동안 용액을 교환하면서 탈회를 실시하였다. 파라핀 블록의 제작과 냉각은 자동 포매장치(Tissue-TEX 4701, Sakura Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 제작된 블록은 회전식 미세 박절기(rotary microtome 2040, Sakura Co.)를 사용하여 조직을 수직방향으로 7 µm 두께로 연속 절편 하여, 부유 운수조와 신전기 과정을 거쳐 슬라이드에 부착시켰다. 제작된 조직 슬라이드는 염증성 침윤 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

관절염 유발에 따른 골구조 측정

실험 종료 후 실험군별 rat의 골구조 변화를 측정하기 위해 three-dimensional micro-CT 촬영을 시행하였다. 동물을 희생시켜 양쪽 앞다리를 적출하여 formaldehyde(Junsei)에 고정시킨 후 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에 의뢰하여 high resolution micro-CT(Skyscan 1172, Skyscan, Kontich, Belgium)로 왼쪽 앞발을 촬영하였다. 골 부피(bone volume, BV), 골 표면적(bone surface area, BS), 조직 전체 부피(total tissue volume, TV)를 바탕으로 골의 부피와 조직 전체 부피의 비율(BV/TV), 골표면적과 골부피의 비(BS/BV), 치밀골의 두께(trabecular thickness, Tb.Th.) 등 분석결과를 바탕으로 관절염 유발에 따른 SD rat의 골지표를 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 얻어진 결과는 SPSS 20.0 software(SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군간 평균 차

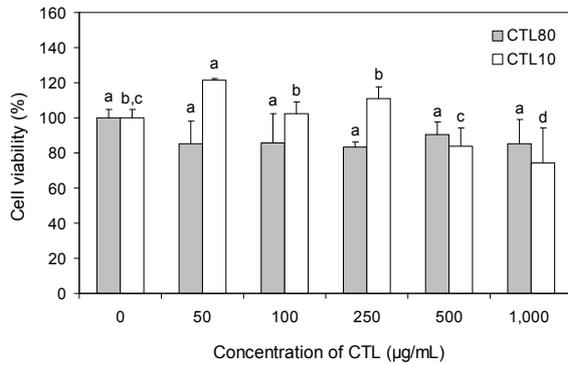


Fig. 1. Cell viability of primary cultured rat cartilage cells, determined by MTT reagent, with treatment of CTL extracts at various concentrations. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다( $p < 0.05$ ).

## 결과 및 고찰

### MTT에 의한 실험 적정농도의 결정

Primary culture된 연골세포에 대한 꾸지뽕 잎 추출물의 적정농도를 결정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 꾸지뽕 잎 10% 에탄올(CTL10), 80% 에탄올(CTL80) 추출물 가운데 CTL10의 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도를 제외한 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았으며, CTL10 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서만  $74.3 \pm 12.9\%$ 로 유의적으로 세포생존율을 감소시켜 세포에서 독성이 나타난 것으로 확인되었다(Fig. 1).

### $\text{H}_2\text{O}_2$ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제효과

골관절염 실험에 대한 *in vitro* 모델은 LPS 또는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 염증을 유발하는 것이 일반적으로 알려져 있다(20,21). 골관절염에 있어서 가장 중요하게 여겨지는 점은 연골세포의 사멸억제와 세포재생에 초점이 맞추어져 있다. 단순히 염증을 유발할 경우는 LPS로도 충분하겠지만 세포사멸을 유도하기 위해서는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 실험하는 것이 적절할 것으로 판단하여(22) 시간별, 농도별로 실험한 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$  300  $\mu\text{M}$ 에서 2시간을 처리할 경우 시험대조군에서 50~68% 정도의 사멸을 나타내는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 이러한 기존의 실험을 바탕으로 꾸지뽕 잎 추출물을 처리한 결과 CTL80의 경우 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $\text{H}_2\text{O}_2$  비처리 정상세포군의 수준까지 연골세포사멸 억제효과가 나타났으며, CTL10에서는 300  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의적으로 연골세포 재생이 나타난 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 CTL80의 200  $\mu\text{g/mL}$  농도와 CTL10의 300  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포사멸억제가 가장 효과적으로 나타나는 것을 확인하였으며 동물실험 시료 사용에 있어서 적정농도를 결정하는 기

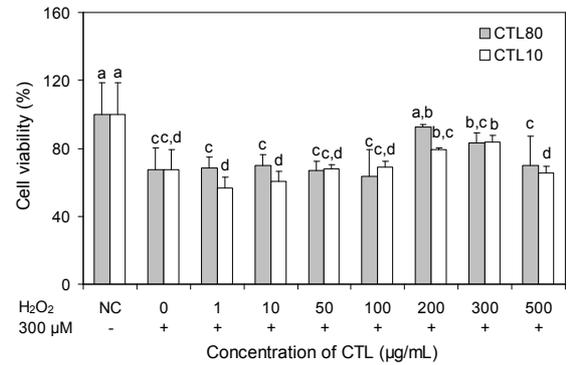


Fig. 2. Effects of CTL extracts on cell survival against 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

준으로 참고하였다. 그러나 두 샘플의 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 모두 세포사멸억제에 대한 샘플의 효과가 감소하는 것으로 나타났으며 시험대조군과 유의적 차이가 나지 않았다.

### $\text{H}_2\text{O}_2$ 산화적 독성에 대한 MMPs mRNA 발현의 변화

연골조직이 파괴되면 일반적으로 MMPs가 활성화되어 발현이 증가한다. MMPs는 골 및 연골의 기질 구성요소를 파괴하는 단백 분해효소로서 정상조직의 분화, 창상 치유, 기관 형성, 생식, 혈관생성, 조직흡수 및 재형성 등의 과정에 주요한 역할을 하며 관절염 등의 병적인 상태에서도 발현되어 병인에 주요한 역할을 한다(23,24). MMP-7과 MMP-13의 경우 류머티스관절염에 비해 골관절염에서 특히 발현이 증가하는 것으로 알려져 있어(11) 관절염 유발에 대한 바이오마커로 선정하여 실험을 진행하였다. 앞선  $\text{H}_2\text{O}_2$  산화적 독성에 의한 세포사멸 실험 결과에서 CTL80과 CTL10 모두 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포사멸억제 효과가 감소한 것으로 나타나, MMPs 발현 변화 측정 실험에서는 샘플의 최대농도를 300  $\mu\text{g/mL}$ 로 하여 실험을 진행하였다.

$\text{H}_2\text{O}_2$  산화적 독성에 대한 연골세포의 MMPs 유전자 발현량 변화를 측정한 결과 MMP-7과 MMP-13 모두에서 정상세포에 비해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만을 처리한 세포에서 발현정도가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. MMP-7 발현 측정 결과, CTL80과 CTL10의 모든 농도에서 유의적으로 발현이 감소되었으며 CTL10의 경우 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 가장 효과가 좋은 것으로 관찰되었다(Fig. 3A). MMP-13 발현 측정 결과, CTL80의 100, 200, 300  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 유의적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났으며, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서는 아무것도 처리하지 않는 세포와 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. CTL10의 경우 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 오히려 MMP-13의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만 처리한 세포와 비교하여 유의적인 차이는 없었다. 이에 비하여 200, 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의성 있게 MMP-13의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 낮은 농도에서는 연골세포의 보호효과가 미미하며, 일정한

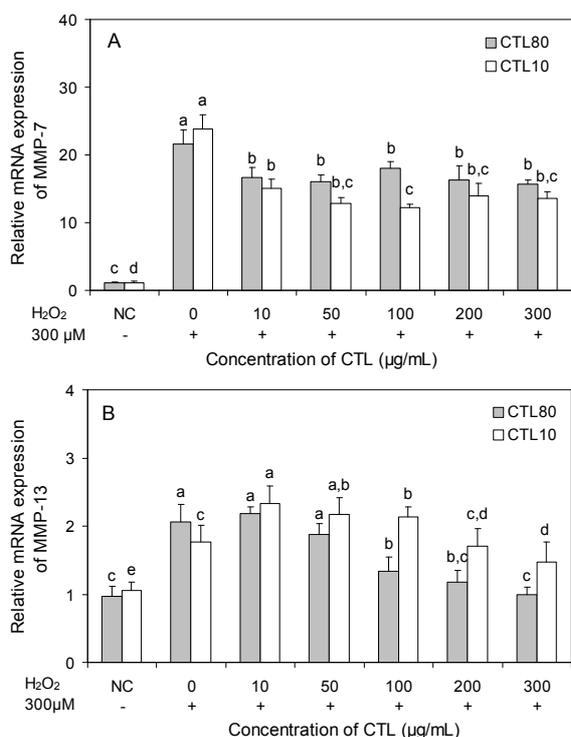


Fig. 3. Effects of CTL on genetic expression of catabolic factors (MMPs) in primary cultured cells. A, MMP-7; B, MMP-13. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at p<0.05.

농도범위에서 연골세포 보호효과가 효과적으로 나타난 것으로 생각된다(Fig. 3B).

이상의 실험결과를 통해서 꾸지뽕나무의 잎 에탄올 추출물이 산화적 독성에 의해 증가한 MMPs의 발현을 감소시키고 연골세포에서 보호효과가 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 꾸지뽕나무 잎에서 관절염 증상을 완화시키고 연골 보

호 및 예방 효능을 지니는 기능성 소재로써 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다.

실험 기간 중 mouse 체중의 변화 및 식이섭취 효율

총 실험기간 6주 동안 매주 2회 식이섭취량과 체중을 측정하였으며, 실험 기간 동안 급여한 물과 식이는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 하루 한 마리의 섭취량을 계산하여 칼로리로 변환 후 식이섭취 효율로 나타내었다. 6주 동안 rat의 몸무게 변화에서는 Normal 군에 비해 Control 군에서 유의적으로 몸무게 증가량이 감소한 것으로 나타났고 식이섭취 효율의 경우 CTL80-500군에서 효율이 감소한 것으로 나타났으나 그룹 간 유의적인 차이는 없었으며, 이러한 결과로 미루어 볼 때 꾸지뽕잎의 섭취가 몸무게 증가 및 증상에 영향을 미치지 않았다는 것을 확인하였다(Table 3).

골절염 유발에 따른 골구조의 형태학적 변화

MIA(Sigma-Aldrich) 주입에 의한 골관절염 유발모델에서 SD rat의 chondrocyte의 metabolism 저해로 인해 뼈의 구조 및 밀도의 양적 변화가 발생하며(25), 이러한 병리학적 변화를 관찰하기 위하여 동물을 희생시킨 후 각 실험군별 동물의 왼쪽 앞발을 micro-CT로 촬영하여 사진과 함께 분석수치를 제시하였다. Micro-CT 사진으로 관절염 유발에 따른 뼈 조직의 확연한 차이를 구분할 수는 없었으나(Fig. 4), 정상군에 비해 Control 군에서는 발가락 전체의 밀도나 두께가 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 양성대조군인 MTX 처리군은 Control 군에 비해 전반적으로 좋은 골 상태를 보이고 있고, CTL80과 CTL10의 경우도 양성대조군과 비슷한 경향을 나타낸 것으로 관찰되었다. Micro-CT 촬영사진 결과를 정확하게 판독하기 위하여 정량화한 수치로 분석한 결과는 Table 4에 나타내었다. BS/BV는 관절염의 유발에 따

Table 3. Weight gain and food efficiency ratio (FER)

Groups	Induced arthritis	Weight gain (g) <sup>1)</sup>	Food intake (kcal/day)	FER <sup>2)</sup>
Normal	-	229.85 $\pm$ 8.86 <sup>a</sup>	86.53 $\pm$ 9.05 <sup>a</sup>	0.068 $\pm$ 0.025
Control	+	207.88 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>	81.20 $\pm$ 9.41 <sup>a</sup>	0.075 $\pm$ 0.010
MTX	+	193.20 $\pm$ 9.31 <sup>b,c</sup>	81.34 $\pm$ 10.73 <sup>a</sup>	0.061 $\pm$ 0.049
CTL10-200	+	219.9 $\pm$ 6.64 <sup>c</sup>	83.90 $\pm$ 5.05 <sup>a</sup>	0.067 $\pm$ 0.032
CTL10-500	+	206.18 $\pm$ 8.67 <sup>c</sup>	85.63 $\pm$ 4.37 <sup>a</sup>	0.062 $\pm$ 0.070
CTL80-200	+	190.30 $\pm$ 7.09 <sup>c</sup>	89.09 $\pm$ 8.31 <sup>a</sup>	0.055 $\pm$ 0.022
CTL80-500	+	173.73 $\pm$ 4.62 <sup>c</sup>	87.36 $\pm$ 6.84 <sup>a</sup>	0.051 $\pm$ 0.048

<sup>1)</sup>Weight gain (g)=final body weight (g)-initial body weight (g).

<sup>2)</sup>FER (food efficiency rate)=gain of body weight (g)/ food intake calories (kcal/day)

Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at p<0.05.

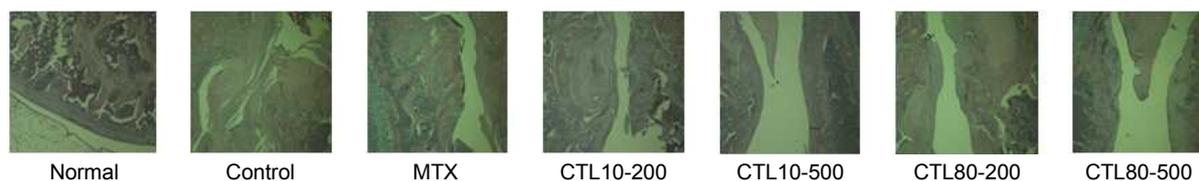


Fig. 4. Histological investigations in knee joints of normal rat and MIA rat with and without CTL treatments. Rats were sacrificed after 6 week experiment and their knee joints were analyzed for histology after H&E staining.

Table 4. Values of architectural and mineralization parameters

Groups	Induced arthritis	BS/BV <sup>1)</sup> (mm <sup>-1</sup> )	BS/TV <sup>2)</sup> (mm <sup>-1</sup> )	Tb.Th <sup>3)</sup> (mm)	Tb.Sp <sup>4)</sup> (mm)
Normal	-	4.59±0.18 <sup>c</sup>	4.44±0.06 <sup>c</sup>	0.96±0.09 <sup>d</sup>	0.07±0.01 <sup>c</sup>
Control	+	6.87±0.05 <sup>d</sup>	6.26±0.54 <sup>b</sup>	0.56±0.03 <sup>ab</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>
MTX	+	5.41±0.05 <sup>b</sup>	5.04±0.30 <sup>a</sup>	0.67±0.04 <sup>c</sup>	0.07±0.01 <sup>c</sup>
CTL10-200	+	6.36±0.25 <sup>a</sup>	5.79±0.23 <sup>d</sup>	0.58±0.02 <sup>ab</sup>	0.12±0.00 <sup>a</sup>
CTL10-500	+	5.96±0.38 <sup>ac</sup>	5.06±0.31 <sup>a</sup>	0.60±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>ab</sup>
CTL80-200	+	5.70±0.37 <sup>bc</sup>	4.66±0.03 <sup>ac</sup>	0.58±0.03 <sup>ab</sup>	0.09±0.02 <sup>b</sup>
CTL80-500	+	6.10±0.24 <sup>a</sup>	4.49±0.21 <sup>c</sup>	0.72±0.02 <sup>c</sup>	0.07±0.02 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>BS/BV: bone surface area/ bone volume. <sup>2)</sup>BS/TV: bone surface area/ total tissue volume.

<sup>3)</sup>Tb.Th: trabecular thickness. <sup>4)</sup>Tb.Sp: trabecular spacing.

Data are expressed as mean±SD (n=4/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at p<0.05.

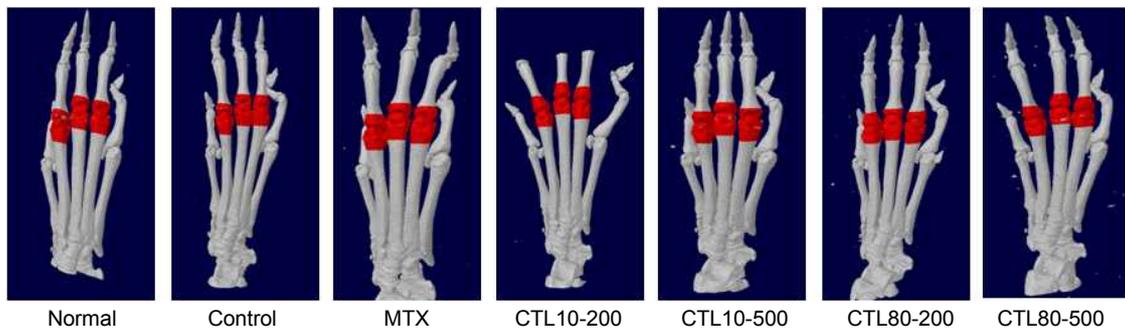


Fig. 5. Micro-CT analysis of the hind paws of normal rat and MIA rat with and without CTL treatment. Rats were sacrificed after 6 week experiment and their hind paws were analyzed for histology after micro-CT. Representative micro-CT photos are shown for each group.

른 골 표면의 복잡성을 나타내는 것으로 수치가 낮을수록 골 강도가 강한다, 이 값은 Control 군의 49.67%에 비하여 CTL80-200군과 CTL10-500군에서 각각 24.18%, 29.85%로 수치가 유의적으로 감소하였다. 전체 조직에 비례한 골 표면의 밀도를 나타낸 BS/TV의 측정 결과 역시 CTL10과 CTL80에서 효과가 나타난 것으로 보이며, 특히 CTL80-200군에서 Control 군의 40.99%에 비해 36.04%로 수치가 감소하였다.

골 소주끼리의 간격을 나타내는 Tb.Sp는 간격이 좁을수록 골밀도가 강한 것을 나타내며 실험군 간의 큰 차이는 없었으나, CTL80-500에서 수치가 감소하여 정상군과 비슷한 값을 보였다.

골 소주 사이의 두께를 나타내는 Tb.Th의 경우 관절염 유발에 따라 두께가 감소하며, 즉 Tb.Th의 값이 증가할수록 건강한 골 상태를 나타낸다. 실험결과, Normal 군 100%에 비해 Control 군에서 값이 58%로 낮아져 관절염의 유발로 인한 골 소주 두께의 감소가 나타났음을 확인하였다. 양성대조군인 MTX 군에서는 Control 군에 비해 수치가 11%로 유의적으로 증가한 것을 관찰하였으며, CTL80-500에서는 이보다 높은 17%로 샘플 투여에 따른 효과가 나타난 것을 확인하였다.

#### 조직학적 결과

MIA(Sigma-Aldrich) 주입에 의한 골관절염 유발모델에서 SD rat의 골구조 변화의 특징은 chondrocyte의 metabolism 저해로 인해 연골세포가 사멸되어 연골층의 두께가 얇

아지고 활액의 증식과 염증세포의 침투로 연골표면의 모양이 비정상적으로 변화한다(26,27). 이러한 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 동물을 희생시킨 후 각 실험군별 동물의 연골조직을 H&E 염색을 하여 연골세포와 활액 주변 변화를 관찰하였다.

일반적으로 정상적인 관절강에서는 세포의 형태가 둥글게 나타나는 반면 염증이 유발하여 chondrocytes가 사멸하는 경우 세포가 작게 밀집하거나 형태를 확인하기 어려운 정도로 침윤되기도 한다(28).

H&E 염색의 결과 Normal 군에 비해 Control 군의 관절강 연골층의 모양이 비정상적으로 변한 것을 볼 수 있으며, 양성대조군인 MTX는 관절강에도 염증이 나타나지만 Control 군보다는 양호한 것을 확인할 수 있었다. 특히 CTL80-200군과 CTL10-500군에서 효과가 가장 높게 나타나는 것을 관찰하였다. 조직학적인 변화도 형태학적인 변화를 관찰한 결과와 비슷한 양상을 나타냈다(Fig. 5).

이상의 실험결과를 통해서 꾸지뽕나무의 잎 80%와 10% 에탄올 추출물이 hydrogen peroxide에 의한 연골세포 손상에서 연골보호 효과가 증가되었으며, 약물에 의해 유도된 골관절염 모델에서 연골세포의 손상과 뼈조직의 손상을 완화시켰음을 확인하였다. 따라서 꾸지뽕나무는 골관절염에 대한 보호효과뿐만 아니라 예방 효능을 지니는 기능성 소재로서 활용가치 및 실용 가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다.

## 요 약

## 문 헌

본 실험에서는 primary culture된 연골세포 *in vitro* 실험 모델과 MIA로 유발한 골관절염 *in vivo* 실험모델을 이용하여 꾸지뽕나무 잎 추출물의 관절염 예방 효과를 확인하였다. 먼저 MTT 시험법을 통해 세포 사용 적정농도를 500 µg/mL 이하로 결정하여 연골세포사멸 억제를 확인하고, 이를 근간으로 골관절염 동물실험 모델에서 골관절염 예방효과를 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 산화적 독성으로 연골세포 사멸을 유도한 실험에서 꾸지뽕 잎 추출물은 정상세포 수준으로 사멸을 억제하였으며, 이러한 효과는 CTL80의 200 µg/mL, CTL10의 300 µg/mL 농도에서 비교적 높게 나타났다. 교원질 합성을 억제하고 분해를 촉진시키는 MMPs(MMP-7, MMP-13)의 발현을 실시간 정량 PCR로 측정하여 발현 변화를 살펴보았다. 그 결과 앞선 세포실험 결과와 마찬가지로 CTL80과 CTL10 처리군에서 발현이 유의적으로 낮아졌음을 살펴볼 수 있었다. 특히 CTL80에서 MMP-7과 MMP-13의 발현이 농도 유의적으로 감소하였으며, CTL10의 경우 200, 300 µg/mL 농도에서 유의적으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 세포실험 결과를 바탕으로 동물실험에서의 적정농도를 결정하였으며, 동물독성실험 결과 이상이 없음을 확인하고 실험을 진행하였다. 이때 세포실험결과 선정된 두 농도(200, 300 µg/mL) 간의 차이가 미미하여 동물실험에 적용할 경우 비슷한 실험결과가 나타날 것으로 사료되어 두 실험군 간의 결과를 정확히 구분 짓기 위해 200, 500 µg/mL 농도를 선정하여 사용하였다. 골관절염 유발 동물모델을 만들기 위해 SD rat의 관절강에 MIA를 injection 하였으며, 꾸지뽕 잎 에탄올 추출물 투여에 따른 관절염 예방 효과를 관찰하기 위해 관절염 유발 2주일 전부터 1일 1회 경구투여를 실시하고, 유발 후 3주간 지속적으로 투여하고 관찰하였다. 동물 관절의 병리학적 변화를 관찰하기 위하여 Micro-CT 촬영 및 분석을 실시한 결과 Control 군은 골의 강도와 밀도가 감소한 반면, 양성대조군인 MTX 투여군에서 정상군과 비슷한 수준으로 회복된 것을 확인하였고, CTL80-200 군과 CTL10-500군에서 Control 군에 비해 유의적으로 수치가 감소하여 골관절염에 따른 손상이 감소한 것을 확인하였다. 동물의 관절조직의 H&E 염색을 통한 조직학적인 변화에서는 골관절염 유발로 연골세포의 손상과 뼈조직의 손상을 관찰하였으며 관절형태를 알아볼 수 없을 정도로 손상된 것을 확인하였다. 반면 CTL80과 CTL10에서는 관절강 세포의 형태가 정상군과 비슷한 둥근모양을 띤 양상을 보였으며 연골조직의 형태가 잘 유지되어 Control 군에 비해 꾸지뽕잎의 투여효과가 나타났음을 관찰하였다. 이상의 결과를 통하여 꾸지뽕 잎 에탄올 추출물은 높은 항관절염 효과가 있을 것으로 사료되며, 항관절염 효능을 지니는 기능성 소재로써 개발 가능성을 확인하였다.

1. Korea National Health and Nutrition Examination Survey. 2001. Ministry of Health and Welfare. Seoul, Korea. p 51.
2. Senior Statistical Reports. 2010. The Statistics Korea. Daejeon, Korea. p 5.
3. Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. 2011. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J Knee Surg* 24: 251-264.
4. Wu W, Xu X, Dai Y, Xia L. 2010. Therapeutic effect of the saponin fraction from *Clematis chinensis* Osbeck roots on osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate through protecting articular cartilage. *Phytother Res* 24: 538-546.
5. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. 2007. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 8: 493-500.
6. Herrington C, Hall P. 2008. Molecular and cellular themes in inflammation and immunology. *J Pathol* 214: 123-125.
7. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Samà D, Calatroni A. 2009. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem* 160: 83-92.
8. Phitak T, Choocheep K, Pothacharoen P, Pompimon W, Premanode B, Kongtawelert P. 2009. The effects of p-hydroxycinnamaldehyde from *Alpinia galanga* extracts on human chondrocytes. *Phytochemistry* 7: 237-243.
9. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S, Taiwo YO. 2001. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 751-760.
10. Okada A, Okada Y. 2009. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis. *Clin Calcium* 19: 1593-1601.
11. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 59: 455-461.
12. Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 115-120.
13. Oh PS, Lim KT. 2011. Anti-inflammatory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau: involvement of MAPK/NF-κB signaling. *Immunol Invest* 40: 76-91.
14. Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh H, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. 2002. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci* 70: 2599-2609.
15. Lee BW, Kang NS, Park KH. 2004. Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 270-273.
16. Choi MS, Kwak SS, Liu JR, Lee IK, Yoo ID. 2001. Production of novel flavonoids in cell cultures of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Plant Tissue Culture* 28: 159-164.
17. Lee JW, Do JH. 2005. Market trend of health functional food and the prospect of ginseng market. *J Ginseng Res* 29: 206-214.
18. Kim HK. 2004. Current status and prospects of nutraceuticals. *Food Industry and Nutrition* 9(1): 1-14.

19. Sakuma S, Nishigaki F, Magari K, Ogawa T, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T. 2001. FK506 is superior to methotrexate in therapeutic effects on advanced stage of rat adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res* 50: 509-514.
20. Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY, Henrotin Y. 2003. Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Res* 52: 111-118.
21. Asada S, Fukuda K, Oh M, Hamanishi C, Tanaka S. 1999. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm Res* 4 8: 399-403.
22. Khan IM, Gilbert SJ, Caterson B, Sandell LJ, Archer CW. 2008. Oxidative stress induces expression of osteoarthritis markers procollagen IIA and 3B3(-) in adult bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 698-707.
23. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ. 2003. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum* 48: 1292-1301.
24. Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ. 2005. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum* 52: 2386-2395.
25. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. 2003. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 821-830.
26. Combe R, Bramwell S, Field MJ. 2004. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett* 370: 236-240.
27. Holderbaum D, Haqqi TM, Moskowitz RW. 1999. Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. *Arthritis Rheum* 42: 397-405.
28. Sulzbacher I. 2012. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* doi: 10.1007/s10354-012-0168-y.

(2013년 1월 28일 접수; 2013년 4월 8일 채택)