

굴 패각 추출물이 Papain으로 유도된 골관절염 C57BL/6J Mice에 미치는 영향

이세영¹ · 김학주² · 한지숙^{1*}

¹부산대학교 식품영양학과

²(주)서진바이오텍

Effects of Oyster Shell Extract on Papain-induced Osteoarthritis in C57BL/6J Mice

Se-Young Lee¹, Hak-Ju Kim², and Ji-Sook Han^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Seojin Biotech Co., Ltd, Gyeonggi 443-373, Korea

ABSTRACT We investigated the effects of oyster shell extract (OSE) on papain-induced osteoarthritis in C57BL/6J mice. Osteoarthritis was induced in mice by a papain injection into the knee joint. The mice were divided into a total of five groups (n=8). The normal group was untreated, whereas the papain group (negative control) was induced with osteoarthritis and treated with water daily. The papain+DS group (positive control) was treated with diclofenac sodium. Papain+OSE groups were treated with OSE concentrations of 100 and 200 mg/kg/bw for 20 days. Proteoglycan content in articular cartilage was analyzed through safranin-O fast green staining and H&E staining. The histopathological changes in cartilage were measured by the Rudolphi score approach. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6 in plasma were analyzed by the ELISA method. After experiments, body weights of the treated groups were not significantly different compared with the normal group. Cartilage loss and joint instability significantly improved in a dose-dependent manner in the OSE-treated group compared with the papain group ($P<0.05$). Proteoglycan content was significantly higher in the OSE-treated group than the papain group ($P<0.05$). Osteoarthritis scores of the OSE-treated group were significantly decreased compared with the papain group ($P<0.05$). TNF- α , IL-1 β , and IL-6 content in the plasma of the papain+OSE treated groups significantly decreased in a dose-dependent manner compared with the papain group ($P<0.05$). These results suggest that OSE treatment might have anti-arthritis effects on papain-induced osteoarthritis in C57BL/6J mice.

Key words: ostarthritis, oyster shell, C57BL/6J mice

서 론

골관절염은 가장 흔한 관절질환으로 전체 근골격계 질환 중에서 골다공증 못지않게 흔하며, 65세 이상의 과반수와 75세 이상의 80%가 골관절염 환자로 노인에게 발병하기 쉬운 질환이다. 특히 우리나라의 경우 세계에서 유례가 드물게 고령화 사회가 빨리 되어감에 따라 골관절염 환자는 더욱 증가할 것으로 예상된다(1,2). 골관절염은 연골에 장애가 생기는 질환으로 매우 느리게 진행되며 연골의 손상, 연골하골의 변성, 활막 조직의 염증 발생과 같은 특징을 가지며 무릎의 통증 및 무릎 관절의 경직과 같은 증상을 동반한다. 현재까지 관절염의 명확한 원인은 규명되지 않았지만 노화나 무릎관절에 무리를 주는 과체중, 유전, 관절의 외상 병력 등이 주요 위험 요인으로 인식되어 있다(3).

골관절염에 대한 치료는 체중조절, 운동치료, 약물치료와 수술치료가 시행되고 있다. 흔히 사용되는 약물치료제인 비스테로이드성 항염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs)는 소화기계 및 혈액응고기전의 부작용으로 속 쓰림, 위출혈 등을 유발할 수 있어 장기투여에 있어서 신중을 가해야 한다. 또한 질병 완화 골관절염 치료제의 경우 질환의 초기에 사용되어 관절의 파괴를 예방하는데 효과가 있으나 골수억제, 간 기능 손상과 더불어 발암의 위험성이 있다(4,5). 수술치료의 경우 수술 후 관절의 강직, 감염 등의 부작용을 유발할 수 있어 제한적으로 시술되고 있다(6). 이처럼 현재까지 골관절염의 적절한 치료법은 미흡한 수준이며 완치할 수 있는 치료법이 미비하여 과학적으로 검증되지 않은 약물이나 민간요법 등에 의존하는 경우가 많은 실정이다(7). 따라서 이러한 문제를 보완하여 보다 안전하고 효과적인 천연물 유래의 새로운 골관절염 치료제 개발에 대한 연구가 필요하다.

굴은 다량의 타우린과 글리코젠을 함유하고 있어 심장 및

Received 15 February 2013; Accepted 17 July 2013

*Corresponding author.

E-mail: hanjs@pusan.ac.kr, Phone: 82-51-510-2836

간의 기능 강화 및 콜레스테롤 감소에 의한 동맥경화에 예방 효과가 있으며, 셀레늄을 다량 함유하고 있어 중금속 해독 기능이 있다(8-11). 우리나라 굴 생산량은 연간 약 4만 톤으로 그중 90%에 달하는 굴 폐각이 바다나 해안가에 방치되어 심각한 환경오염을 초래하고 있다. 굴 폐각은 우리나라에서 전통적으로 민간이나 한방에서 피부염 치료제와 같은 약제로 사용되었다. 최근에는 탄산칼슘이 풍부해 칼슘 보충제로 대체 사용하거나 관절염 및 골다공증 예방의 용도로 보편화된 기준이나 과학적 근거 없이 사용하고 있었다(12).

따라서 본 연구에서는 우리나라 양식 사업에 있어 큰 문제가 되고 있는 굴 폐각을 이용하여 환경보호 및 고부가가치 창출을 도모하고, 천연재료인 굴 폐각 추출물이 papain으로 유도된 골관절염 동물 모델의 치료 약물로서의 가능성을 탐색하고자 한다. 이를 위하여 마우스의 우측 무릎관절에 단백 분해물질인 papain을 투여하여 골관절염을 유도시킨 후, 굴 폐각 추출물을 투여하고 연골의 변성, 염증 형성 정도 등의 변화를 관찰하여 굴 폐각 추출물의 골관절염에서의 생리작용을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

본 실험에 사용한 굴 폐각은 경남 통영시 (주)덕연수산에서 굴 폐각시료를 구입하여 사용하였다. 굴 폐각은 세정하여 자연건조 후 에어밀 분쇄장치(HTM100, Powder Technology & System Engineering Co., Gyeonggi, Korea)를 사용하여 800~1,000 mesh로 분말화 하였다. 굴 폐각 추출 방법은 0.5 M의 구연산 10 L에 1 kg의 폐각 분말을 넣고 30°C에서 12시간 반응을 실시하였다. 반응 후 원심분리 과정을 통하여 상층액을 회수한 후 한외여과장치를 이용하여 분리하였으며, 한외여과장치는 QuixStand Benchtop System(GE Healthcare, Westborough, MA, USA)과 323E/D 400 rpm pump(Watson-Mariow Bredel Pump, Falmouth, Cornwall, England)를 사용하여 100 rpm에서 15 psi 압력으로 막분리를 실시하였다. 막분리에 사용된 한외여과막은 Surface area가 420 cm²이고 분자량의 cut-off 값이 10 kDa인 Hollow fiber Cartridge UFP-10-E-4MA(GE Healthcare)를 사용하였다. 추출된 용액은 진공건조 후 -80°C에서 저장하여 사용하였다.

실험동물

8주령의 골관절염 동물 모델인 C57BL/6J mouse 40마리를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 온도 및 습도는 20±2°C, 50±10%로 유지하였고, 명암을 12시간 간격으로 점등 및 소등을 하였으며, 07:00~19:00에 불을 켜두었다. 실험기간 동안 사료(OrientBio, Seoul, Korea)와 음수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 본 연구계획은

부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(PNU-2012-0055)을 받았다.

실험군의 분류 및 골관절염 유발

실험동물을 실험환경에 일주일간 적응시킨 후 체중을 측정하여 각 군당 체중이 고르게 8마리씩 배정하였다. 정상군은 우측 슬관절강에 생리식염수 6 µL 주사하고 20일간 1일 1회 생리식염수 0.2 mL씩 경구투여 하였다. 대조군, 약물투여군, 굴 폐각 추출물 투여군은 우측 슬관절강에 papain 6 µL를 주사하여 골관절염을 유발 후 대조군은 생리식염수를, 약물투여군은 diclofenac sodium(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mg/kg/bw를, 굴 폐각 추출물 투여군의 경우 100, 200 mg/kg/bw를 20일 동안 매일 1회 정해진 시간에 경구투여 하였다.

골관절염의 유발은 papain(type IV, double crystallized, 15 units/mg, Sigma-Aldrich)의 농도가 1.0%(w/v)가 되도록 조정하여 papain이 활성화되도록 0.03 M L-cysteine HCl(Sigma-Aldrich)을 보충한 다음 슬개골 인대를 통과하여 우측 슬관절강에 6 µL를 투여해 골관절염을 유발하였다. Papain 용액은 투여 전 0.2 µm syringe filter에 통과시켜 박테리아를 제거하였다.

체중의 측정

실험개시일 5, 10, 15, 20일에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

표본의 처리

실험 종료일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시켜 심장채혈하고 혈액을 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 심장채혈 직후에 우측 고관절 및 족근관절을 분리하여 슬관절 부위가 손상되지 않도록 적출하였다. 우측 슬관절을 10% 중성포르마린액에 24시간 고정하고 경골을 분리하여 병리학적인 관찰에 사용하였다. 경골 근위단의 관절 표면이 노출되도록 주위 조직을 세밀하게 제거한 후 safranin O 염색에 사용하였다.

관절연골의 proteoglycan 함유율 평가

채취한 슬관절은 10% formalin에 24시간 고정하고, 그 후 파라핀 포매 전 10% formic acid로 72시간 동안 탈회하였다. 탈회된 경골 근위단의 정중 관상단면을 만들고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 µm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 경골 근위단 관절연골 내의 proteoglycan 변성을 확인하기 위하여 박절된 표면을 safranin O 및 hematoxylin 대조염색을 실시하였다. 칼라 영상분석기(Media Cybernetics, Image-ProPlus, Rockville, MD, USA)를 이용하여 모든 관절연골에서의 평균투과도를 측정하였다. 정상군에서 측정된 평균투과도의 평균을 100%로 설정하고, 대조군, 약물투여군, 샘플 투여군의

Table 1. Criteria for histopathological score of osteoarthritic lesions

Matrix structure		Cellularity	
0	Normal	0	Normal
1	Surface irregularities	2	Reduced
3	Superficial fibrillation	5	Strongly reduced
6	Clefts in deep zone	8	Total loss of cartilage and cells
8	Massive loss of cartilage		
Subchondral bone		Synovial membrane	
0	Normal	0	Normal
3	Remodeling processes	3	Mild hyperplasia
8	Thickening, strong sclerosis	5	Severe hyperplasia
		8	Hyperplasia with infiltration of inflammatory cells

투과도를 환산하여 proteoglycan 함유율을 평가하였다.

결과 및 고찰

병리조직학적 관찰 및 골관절염 지수의 평가

대퇴골 및 경골의 내측과(medial condyle) 관절면과 슬관절낭이 포함되도록 슬관절 시상단면을 만들고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 5 µm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 슬관절 박절편을 hematoxylin & eosin(H&E) 염색하고 광학현미경으로 관절연골 및 활막의 병리조직학적 변화를 관찰하였다. 골관절염 지수는 관절연골 및 활막에서 관찰된 병리조직학적 병변을 Rudolphi 등(13)의 방법(Table 1)에 준하여 계수화 하였다.

체중 변화

실험기간 동안 마우스의 체중 변화는 Table 2와 같다. Papain 투여 대조군은 정상군에 비해서 실험 5일부터 실험 20일까지 전 실험기간 동안 체중이 낮았으나 유의성은 없었다. 약물투여군(DS) 및 굴 폐각 추출물 투여군(OSE)은 실험기간 동안 정상군과 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았으며, papain 투여로 인한 마우스 간의 체중변화는 없는 것을 확인할 수 있었다.

혈액 내 사이토카인 함량 측정

혈액 내 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), IL-6의 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay kit(KOMABIOTECH, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 mean±SD로 표시하였고, 각 시료간의 유의성은 one-way ANOVA (analysis of variance)로 사전 검증한 후 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검증하였다.

관절연골의 proteoglycan 함유율

관절연골은 collagen과 proteoglycan으로 구성된 특수한 조직으로, 이 중 proteoglycan은 쇼크 작용으로부터 연골조직을 보호하고 조직 표면에 가해지는 압박을 견딜 수 있는 탄성을 갖게 한다. 골관절염에서는 proteoglycan 성분의 감소가 나타나 관절면 주위에 분포되어 있는 연골의 퇴행성 변화를 야기한다(14). 이러한 proteoglycan의 합성을 촉진하고 분해를 억제하여 proteoglycan 함량을 증진시키는 치료방법은 골관절염의 증상을 완화시키는 주요 방법 중 하나이다(15). 실험종료 후 safranin O 염색하여 관찰한 정상군의 관절연골은 짙은 적색으로 전층이 염색되어 proteoglycan 함량이 풍부한 것으로 관찰되었다. Papain 투여 대조군의 관절연골은 정상군에 비해서 월등히 옅은 색조로 염색되거나 또는 전혀 염색되지 않아 proteoglycan의 손실이

Table 2. Effects of oyster shell extract on the body weights of papain-induced osteoarthritic mice

Group ¹⁾	Body weights (g)				
	0 day	5 days	10 days	15 days	20 days
Normal (n=8)	18.53±0.79 ^{NS2)}	19.52±0.87	20.90±1.07	20.16±0.95	20.77±0.94
Papain (n=8)	18.63±0.99	19.26±1.36	19.95±1.11	19.75±1.36	20.05±1.15
Papain+DS (n=8)	18.45±1.14	19.40±0.99	19.75±0.96	19.53±1.03	19.83±0.86
Papain+OSE-100 (n=8)	18.60±0.91	19.14±0.60	20.00±0.87	19.81±0.75	20.35±0.94
Papain+OSE-200 (n=8)	18.54±0.73	19.04±1.01	19.79±1.22	19.54±1.18	19.91±1.61

¹⁾Normal, saline injected and treated with water group; Papain, papain injected and treated with water group; Papain+DS, papain injected and treated with diclofenac sodium (2 mg/kg/bw) group; Papain+OSE-100, papain injected and treated with OSE (100 mg/kg/bw) group; Papain+OSE-200, papain injected and treated with OSE (200 mg/kg/bw) group; OSE, oyster shell extract.

²⁾Each value is expressed as mean±SD (n=8).

^{NS}Not significant.

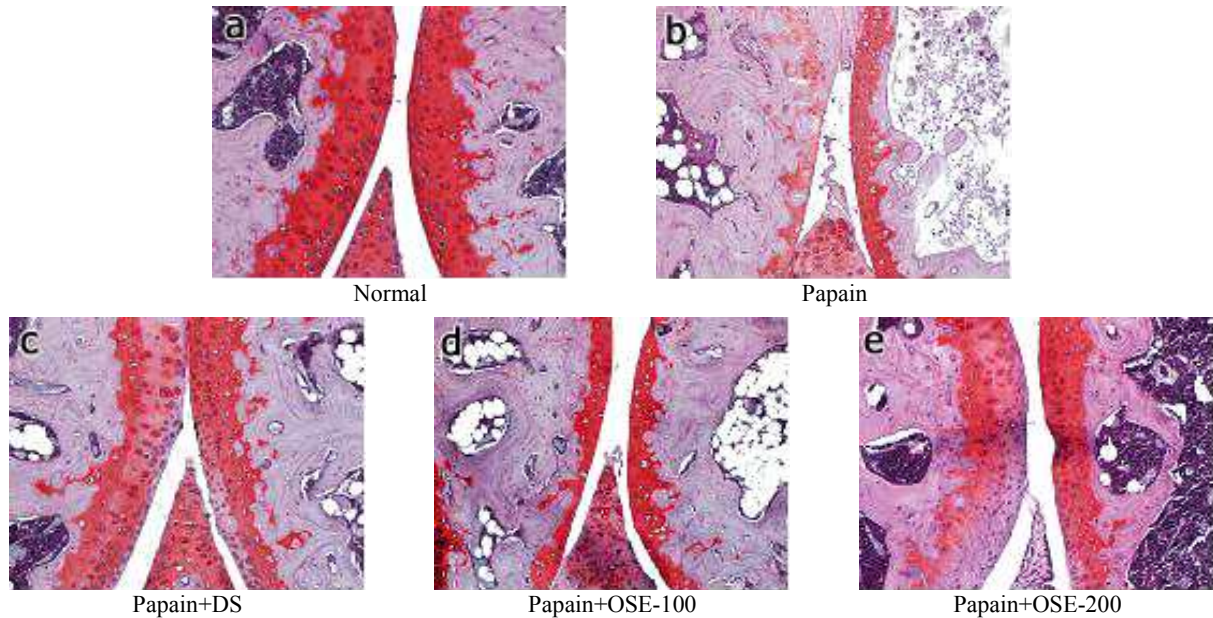


Fig. 1. Safranin O stain intensity of articular cartilage of tibial platues. (a) Stain intensity of red color increased in proportion to proteoglycan content. (b) The red color disappeared in most of articular cartilage. (c) The red color remained in periphery of necrotic area in papain+DS group. (d) Proteoglycan contents in articular cartilages of the OSE-100 treated group were increased compared with papain group. (e) Proteoglycan contents in articular cartilages of the OSE-200 treated group were increased compared with OSE-100 group and papain group.

많음을 관찰할 수 있었다. DS 투여군은 정상군보다 다소 열게 염색되어 있었으나 papain 투여 대조군에 비해서 보다 진하게 염색되어 있었으며, 연골의 표층이 심층보다 더욱 짙게 염색되어 proteoglycan의 함량이 회복되었음을 확인할 수 있었다. OSE 투여군의 경우 대조군에 비해서 짙은 적색으로 염색되어 DS 투여군과 마찬가지로 proteoglycan 함량이 회복되었음을 관찰할 수 있었다. 특히 OSE-200 투여군이 OSE-100 투여군보다 염색된 범위가 넓은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

각 군에서 칼라영상분석기를 통해서 측정된 safranin O 염색 정도를 관절연골내 proteoglycan 함유율로 평가하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. Proteoglycan 함유율은 대조군이 정상군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 낮았으며, DS 투여군은 대조군에 비해 유의성($P<0.05$) 있게 높았다. OSE-100 투여군보다 OSE-200 투여군의 proteoglycan

Table 3. Effects of oyster shell extract on the proteoglycan contents in articular cartilages of papain-induced osteoarthritic mice

Group ¹⁾	Proteoglycan contents (%)
Normal (n=8)	100.00±5.41 ²⁾
Papain (n=8)	48.47±2.88 ^d
Papain+DS (n=8)	88.17±7.41 ^b
Papain+OSE-100 (n=8)	63.76±2.52 ^c
Papain+OSE-200 (n=8)	80.40±6.18 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾Each value is expressed as mean±SD (n=8). Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

함유율이 유의성($P<0.05$) 있게 높았으며, DS 투여군과 유사한 값을 나타냈다. 따라서 본 연구에서의 굴 폐각 추출물은 papain으로 유도된 골관절염에 proteoglycan의 손실을 줄임으로써 골관절염을 완화시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

병리조직학적 소견

굴 폐각은 우리나라에서 전통적으로 민간이나 한방에서 피부염 치료제와 같은 약제로 사용되었다. 또한 최근에는 탄산칼슘이 풍부해 칼슘 보충제로 대체 사용하거나 관절염 및 골다공증 예방의 용도로 보편화된 기준이나 과학적 근거 없이 사용하고 있었다(12). 따라서 본 연구에서는 papain으로 유도된 골관절염에 굴 폐각 추출물이 미치는 영향을 확인하기 위해 H&E 염색을 실시하여 조직학적으로 관찰하였고 그 결과는 Fig. 2와 같다. 생리식염수를 슬관절강 내에 주사한 정상군은 모든 개체의 슬관절을 구성하는 대퇴골 및 경골의 관절연골이 정상적인 구조를 유지하고 있었으며, 관절낭의 활막도 활막세포로 피복된 정상적인 상태를 유지하고 있었으며 퇴행성 변화를 관찰할 수 없었다.

Papain 투여 대조군에서는 모든 개체에서 관절연골의 퇴행성 변화가 관찰되었다. 슬관절은 구성하는 대퇴골 및 경골의 관절연골이 변성 및 괴사되었으며, 연골 내 존재하는 연골세포의 손실도 관찰되었다. 또한 대부분의 연골층이 탈락되어 연골하 골조직이 노출되어 있거나 연골세포의 윤곽이 사라지고 엷게 염색되는 균질한 상태로 관찰되었다. 연골층 탈락으로 관절강 내로 노출되어 있는 연골하 골조직은 파골

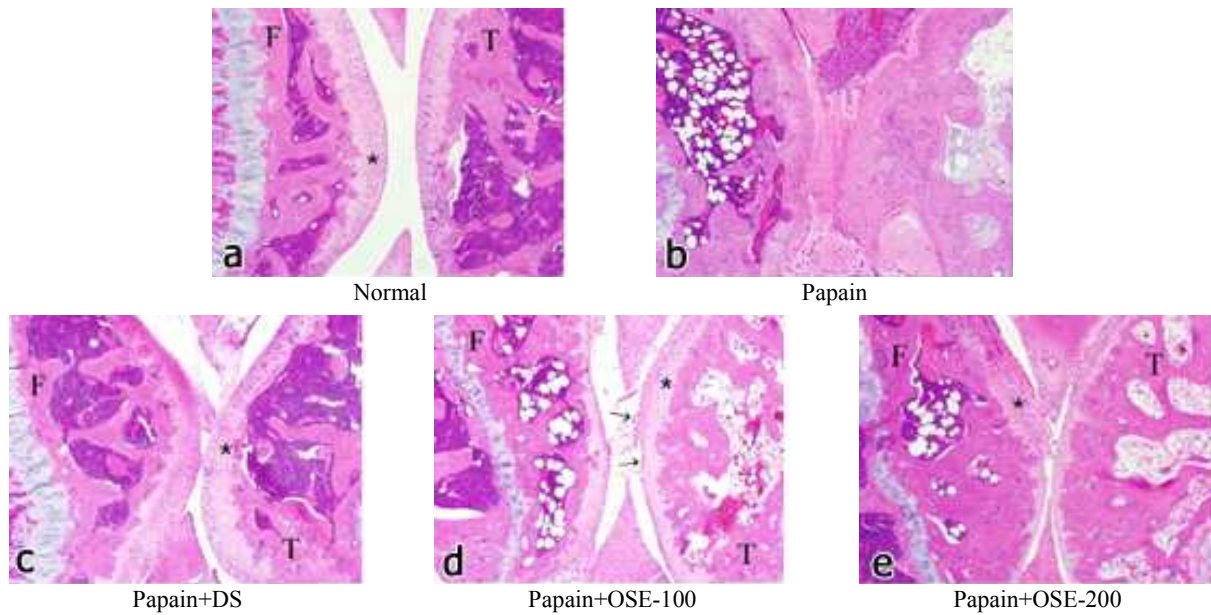


Fig. 2. Microphotograph of articular structure of knee joint. (a) In normal group, articular cartilages (*) are well developed. (b) In papain group, most of articular cartilage was degenerated and desquamated. (c) In papain+DS group, most of articular cartilages (*) are degenerated and appeared homogeneous, but chondrocytes in periphery of degenerated area are remained. (d) In papain+OSE-100 group, most of articular cartilages (*) are degenerated (arrows), and appeared homogeneous. But chondrocytes are remained. (e) In papain+OSE-200 group, most of articular cartilages (*) are degenerated, and appeared homogeneous. But many of chondrocytes are remained. And proliferation of synovial cell layer is more mild than papain group. T, tibia; F, femur; OSE, oyster shell extract.

세포의 활성화로 인한 골조직 침습 및 섬유조직의 증식이 관찰되었다.

DS 투여군은 연골의 표층에서 연골 및 연골세포의 탈락이 관찰되었으나 변성괴사된 관절연골의 범위가 감소되어 있었다. Papain 투여 대조군과 비교하였을 때 염증세포의 침윤과 활막의 비후가 억제되었으며 관절면의 연골손실은 적은 것을 관찰할 수 있었다. OSE 투여군에서 슬관절을 구성하는 관절연골의 병리조직학적 병변은 관절연골의 변성 및 괴사된 범위가 감소되어 있었다. 또한 활막세포의 증식으로 인한 활막의 비후 정도도 papain 투여 대조군에 비해 억제된 것을 관찰할 수 있었다. OSE-200 투여군은 OSE-100 투여군보다 관절연골의 표층에서 연골 및 연골세포의 탈락이 적게 관찰되었으며, 연골 내 존재하는 연골세포의 손실도 적은 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 papain을 투여 후 관절염을 유발시킨 마우스에 작약감초부자탕을 투여한 실험(16)보다 더 우수한 효과를 나타내었으며, 굴 껍질 추출물이 papain으로 유도된 골관절염에서 연골의 변성을 줄이고 염증을 억제함으로써 골관절염 치료에 효과가 있는 것으로 사료된다.

골관절염 지수의 차이

골관절염 연구에 대한 동물 모델은 외과적으로 슬십자인대 또는 슬관절 반월판을 손상시키거나, 슬관절강 내로 papain이나 collagenase를 투여하여 골관절염을 유발한 병태 모델 등이 이용되어져 왔다(17). 본 연구에서는 papain 투여 대조군의 골관절염 지수가 DS 및 OSE 투여군에 비해 유의

성($P<0.05$) 있게 높았다. 따라서 papain이 골관절염을 유발하는 것으로 사료된다. 또한 DS 및 OSE 투여군이 papain 투여 대조군에 비해서 골관절염 지수가 유의성($P<0.05$) 있게 낮았다. OSE-200 투여군이 OSE-100 투여군보다 골관절염 지수가 낮았지만 유의적 차이는 없었다. 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에 사용한 굴 껍질 추출물은 papain으로 유도된 골관절염을 완화시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다(Table 4).

혈액 내 TNF- α 함량 차이

TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되어 염증을 활성화시키는 사이토카인으로 관절연골 기질로부터 proteoglycan 소실을 증가 및 제한성 억제제를 통해 관절연골을 손상시키고 골관절염의 진행을 유도한다(18,19). Papain 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 다량 생성되는 TNF- α 에 대한 굴 껍질 추출물의 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 혈액 내 TNF- α 의 함량은 papain 투여 대조군이 정상군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 높았으며, DS 및 OSE 투여군은 papain 투여 대조군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 낮았다. OSE-200 투여군은 약물 투여군과 유사한 TNF- α 함량을 나타냈으며, OSE-100 투여군에 비해 유의성($P<0.05$) 있게 낮았다.

혈액 내 IL-1 β 함량 차이

IL-1 β 는 연골세포, 활액, 활막세포로부터 염증매개물질의 생성과 분비를 촉진시켜 연골 기질의 파괴를 증가시키며

Table 4. Effects of oyster shell extract on the histopathological osteoarthritic scores of the knee joints of papain-induced osteoarthritic mice

Group ¹⁾	Matrix structure	Cellularity	Subchondral bone	Synovial membrane	Sum of osteoarthritic score
Papain	5.0	5.0	4.1	5.6	19.8±5.3 ^{a2)}
Papain+DS	2.6	2.0	1.1	1.5	7.4±2.6 ^b
Papain+OSE-100	4.6	3.5	2.9	3.3	14.3±4.5 ^{ab}
Papain+OSE-200	4.3	2.3	2.3	3.1	11.6±5.5 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾Each value is expressed as mean±SD (n=8).

Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

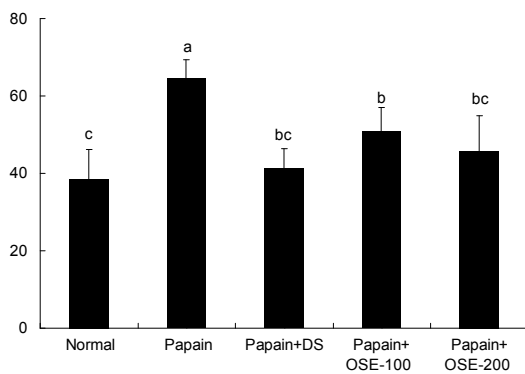


Fig. 3. Effect of oyster shell extract on the TNF- α contents in plasma of papain-induced osteoarthritic mice. Each value is expressed as mean±SD (n=8). Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. Groups are the same as in Table 2.

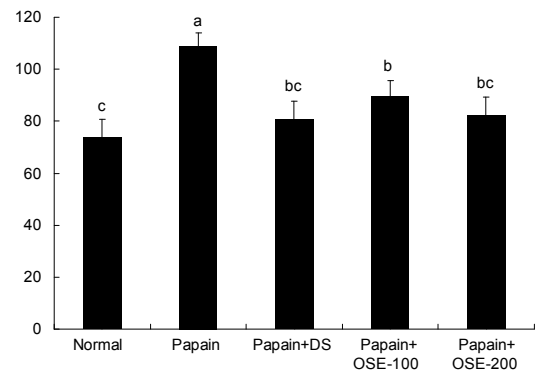


Fig. 5. Effect of oyster shell extract on the IL-6 contents in plasma of papain-induced osteoarthritic mice. Each value is expressed as mean±SD (n=8). Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. Groups are the same as in Table 2.

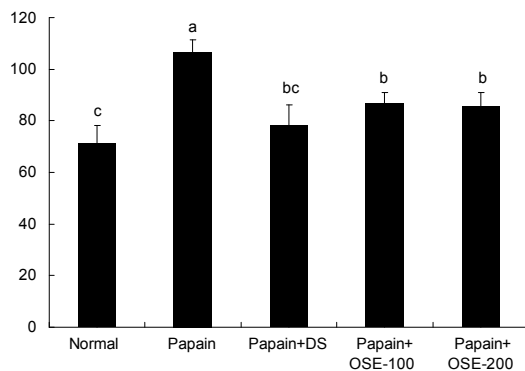


Fig. 4. Effect of oyster shell extract on the IL-1 β contents in plasma of papain-induced osteoarthritic mice. Each value is expressed as mean±SD (n=8). Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. Groups are the same as in Table 2.

(20), proteoglycan 소실율을 증가시키고 재합성을 억제하여 관절연골의 손상을 유발한다(21). 혈액 내 IL-1 β 함량은 papain 투여 대조군에 비해 유의성($P<0.05$) 있게 높았으며, DS 및 OSE 투여군은 papain 투여 대조군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 낮았다. OSE-200 투여군이 OSE-100 투여군보다 IL-1 β 함량이 낮게 나타났지만 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4).

혈액 내 IL-6 함량 차이

IL-6는 IL-1 β 와 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질로 골관절염의 염증반응에 주된 매개 작용을 하여 골관절염의 활성도와 연관이 있다(22). 또한 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비는 과골세포의 분화를 유도하여 국소적인 골 파괴를 촉진한다(23). Papain 주입에 의해 관절염이 유발된 마우스의 IL-6 함량 차이는 Fig. 5와 같다. 혈액 내 IL-6 함량은 papain 투여 대조군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 높았다. DS 및 OSE 투여군이 papain 투여 대조군에 비해서 유의성($P<0.05$) 있게 낮았으며, OSE-200 투여군이 OSE-100 투여군에 비해 IL-6 함량이 유의성($P<0.05$) 있게 낮았다.

요 약

본 연구에서는 굴 패각 추출물이 papain으로 유도된 골관절염 동물 모델에 미치는 영향을 살펴보았다. 8주령의 C57BL/6J 마우스 우측 슬관절강에 papain 6 μ L를 투여하여 골관절염을 유발하였다. 실험군은 각 군당 체중이 고르게 8마리씩 배정하여 총 다섯군으로 분류하였다. 정상군은 우측 슬관절강에 생리식염수 6 μ L 주사하고 20일간 1일 1회 생리식염수 0.2 mL씩 경구투여 하였다. 대조군, 약물투여군, 굴 패각 추출물 투여군은 골관절염을 유발 후 각각 생리식염수, di-

clofenac sodium 2 mg/kg/bw, OSE 100, 200 mg/kg/bw 를 20일 동안 매일 1회 정해진 시간에 경구투여 하였다. 실험기간 동안 체중을 측정하였으며, 실험 20일에 부검하여 슬관절의 병리조직학적 관찰, 관절연골 내 proteoglycan 함유율, 골관절염 지수의 변화, 혈액내 TNF- α , IL-1 β , IL-6 함량을 측정하였다. 체중은 실험기간 동안 모든 개체 간의 유의적 차이가 없었다. 관절연골 내 proteoglycan 함유율은 DS 및 OSE 투여군이 papain 투여 대조군보다 유의성($P < 0.05$)있게 높았으며, 특히 OSE-200 투여군은 약물 투여군과 유사한 proteoglycan 함유율을 나타냈다. H&E 염색을 통하여 관찰한 결과, 골관절염이 유발된 마우스에 굴 폐각 추출물을 경구 투여하였을 때 관절연골의 파괴와 골 침식 등 연골의 변성이 약물 처리군과 유사한 것을 보아 굴 폐각 추출물이 골관절염 치료에 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 병리조직학적으로 골관절염 지수는 DS 및 OSE 투여군이 papain 투여 대조군보다 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았으며, OSE-200 투여군이 OSE-100 투여군보다 낮았다. 혈액 내 TNF- α , IL-1 β , IL-6 함량은 papain 투여 대조군이 정상군에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였으며, DS 및 OSE 투여군은 대조군보다 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다. 특히 TNF- α 및 IL-6 함량은 OSE-200 투여군이 약물 투여군과 유사한 감소 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 굴 폐각 추출물이 papain으로 유도된 골관절염에서 연골의 변성을 줄이고 염증을 억제함으로써 골관절염 치료에 효과가 있는 것으로 사료된다. 굴 폐각은 탄산칼슘이 풍부하기 때문에 골관절염 개선에 효과가 있는 것으로 사료되나, 굴 폐각 추출물 중 어떠한 기능성 물질이 골관절염 개선 효과를 나타내었는지에 대해 향후 심도 있는 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 국토해양부의 국토해양기술연구개발 사업으로 수행된 연구 결과임.

REFERENCES

1. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. 2003. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 602-611.
2. Eom DU, Lee SW, Bea NJ. 2005. Human resource management in the period of ageing and low growth. Report on research of SERI. Korea.
3. Martel-Pelletier J. 2004. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: S31-S33.
4. Lee YJ. 2004. Medical treatment of osteoarthritis. *Korean J Med* 67: 564-567.
5. Bea SC, Corzilius M, Kuntz KM, Liang MH. 2003. Cost-effectiveness of low dose corticosteroids versus non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 specific inhibitors in the long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Rheuma-*

- tology (Oxford)* 42: 46-53.
6. Yoh SB, Sul JU, Shin MS. 2011. Research trends on the treatment of knee osteoarthritis in Korean medicine. *Korean J Acupuncture* 28: 139-155.
7. Won CH, Choi ES, Hong SS. 1999. Efficacy of bee venom injection for osteoarthritis patients. *J Korean Rheum Assoc* 6: 218-226.
8. Han SC, Ryu JS, Lee KY, Kim DM, Choi CS. 2003. A study on the microencapsulation of DHA and antioxidant effect. *J Res Institute Catalysis* 24: 81-90.
9. Park SJ, Kang JY. 2005. Preparation and characterization of calcium alginate microcapsules by emulsification-internal gelation. *Polymer Korea* 29: 369-374.
10. Nishimune T, Sumimoto T, Yakusiji T, Kunita N, Ichikawa T, Doguchi M, Nakahara S. 1991. Determination of total dietary fiber in Japanese foods. *J Assoc Off Anal Chem* 74: 350-359.
11. Mori B, Kusima K, Iwasaki T, Omiya H. 1981. Dietary fiber content of seaweed. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 55: 787-791.
12. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries. 2010. *Development of utilization and Korean medicine material of functional marine product by nano-enzyme techniques*. Korea.
13. Rudolph K, Gerwin N, Verziji N, van der Kraan P, van den Berg W. 2003. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 738-746.
14. Kim JD. 1990. The effects of cationic I on proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage. *PhD Dissertation*. Korea University, Seoul, Korea.
15. An HJ, Lee CK, Park JH, Kim KH, Lee WR, Park IY, Han SM, Lee KG, Park KK. 2012. Effects of bee venom on papain-induced osteoarthritis in an animal model. *Kor J Pharmacogn* 43: 167-172.
16. Lee JM. 2011. Effects of Jakyakkamchobuja-tang on papain-induced osteoarthritis in mice. *PhD Dissertation*. Daejeon University, Daejeon, Korea.
17. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. 1998. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 177-186.
18. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. 2007. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet* 370: 1861-1874.
19. Vilcek J, Lee TH. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple action. *J Biol Chem* 266: 7313-7316.
20. Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Senolt L. 2007. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine* 38: 151-156.
21. Jin SY, Kang SS, Lee DW, Lim SJ, Yoon YH, Lee BI. 2001. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 nitrotyrosine and apoptosis in articular cartilage of human osteoarthritis. *Korean J Pathol* 35: 319-329.
22. Ahmed ST, Ivashkiv LB. 2000. Inhibition of IL-6, IL-10 signaling and star activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* 165: 5227-5237.
23. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. 2008. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity* 28: 440-444.