

In Vivo 실험모델에서 오디추출복합물의 퇴행성관절염 개선 효능 연구

이 화¹ · 윤새별¹ · 신소희¹ · 정종문²

¹(주)벤스랩 중앙연구소

²수원대학교 생명과학과

Effect of Mulberry Extract Complex on Degenerative Arthritis *In Vivo* Models

Hua Li¹, Sat-Byul Yun¹, So Hee Shin¹, and Jong-Moon Jeong²

¹Research Center of Ben's Lab Co., Ltd.

²Department of Life Science, The University of Suwon

ABSTRACT The objective of this research was to investigate the *in vivo* effects of treatment with mulberry extract complex (MEC) on cartilage degeneration and pain severity in an experimental model of rat degenerative arthritis. Monosodium iodoacetate (2 mg/50 μ L) was injected into right knee joints of rats, followed by administration of MEC for 8 weeks at 400 mg/kg or 800 mg/kg of body weight. The experimental data show that treatment with MEC inhibited degradation of glycosaminoglycan and collagen in cartilage. On the other hand, concentrations of cartilage oligomeric matrix protein, C-terminal telopeptide-2, matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and MMP-13 in serum decreased in comparison with the control. The MEC at all dose levels could inhibit formation of xylene-induced ear edema. In this study, MEC demonstrated significant anti-arthritis activity, which is required for improvement of degenerative arthritis. Based on these results, MEC may be employed for the development of new health foods to ease symptoms of degenerative arthritis.

Key words: MEC, degenerative arthritis, cartilage degeneration, pain severity, xylene-induced ear edema

서 론

현대사회는 노인 인구 증가로 인해 고혈압에 이어 노인들에게 많이 발생하는 만성질환인 관절염의 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 2014년 노인실태조사에 따르면 65세 이상 노인의 만성질환 중 관절염은 33.4%를 차지하여 두 번째로 높은 유병률을 나타냈다(1).

퇴행성관절염(degenerative arthritis)은 골관절염(osteoarthritis)이라고도 하며 가장 흔한 관절염의 유형으로 주로 관절을 보호하는 연골의 퇴행성 손상으로 인해 염증과 통증이 유발되는 질병이다. 일반적으로 노화가 주요 발병원인이지만 성별, 유전적 요소, 비만, 생활습관 등 다른 요인으로 발병하는 경우도 있다(2-4). 2013 국민건강영양조사에 따르면 만 50세 이상 골관절염 유병률은 전체의 12.5%로 60대에서는 50대 유병률의 3배, 70대 이상에서는 5배로 나이가 많아질수록 유병률이 높아졌다(5). 우리 사회가 고령화될수록 골관절염 환자의 수는 증가할 전망이다.

관절염 환자의 치료 목표는 크게 통증을 최소화하는 것,

관절의 파괴를 막아 장기적으로 관절 변형과 장애를 최소화하는 것, 또한 환자에게 부담이 적으면서 효과가 좋은 약물을 적절히 이용하는 것이다. 관절염에 공통으로 쓰이는 약물은 비스테로이드 항염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)로 우리나라에서 100여 종 이상의 다양한 상품명으로 판매되고 있는데, 이는 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 활성을 억제하여 prostaglandin E2의 합성을 감소시킴으로써 통증과 염증을 억제하는 작용을 한다. 이는 해열, 진통, 항염의 효과가 있으나 위장관, 신장, 심장, 간장 및 혈액학적 부작용을 동반할 수 있으며(6), 근본적인 치료가 불가능하므로 다른 치료제의 개발이 절실하다.

오디(mulberry)는 뽕나무과(Moraceae) 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매이다. 오디는 베리(berry)류로 다른 식물에 비해 안토시아닌 계열의 색소(cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside) 및 다양한 페놀화합물을 함유하고 있다. 현재까지 알려진 오디의 생리활성 기능들에는 항당뇨, 항산화, 항암 효과 등이 있다(7-13). 상엽(mulberry leaf)은 뽕나무의 잎으로 rutin, chlorogenic acid, quercetin 3-(6-malonylglucoside), kaempferol 3-(6-malonylglucoside) 등 다양한 페놀화합물들이 다량 함유되어 있어 항암 활성 및 간 보호 등의 생리활성들을 나타낸다고 보고되어 있다(14-19). 서리태(black

Received 12 January 2016; Accepted 25 February 2016

Corresponding author: Jong-Moon Jeong, Department of Life Science, The University of Suwon, Hwasung, Gyeonggi 18323, Korea

E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr, Phone: +82-31-222-6514

bean)는 흑두 또는 검정콩으로 불리며 속이 파랗다고 하여 속청이라고도 부른다. Daidzein, genistein과 같은 isoflavone이 다량 함유되어 있어 에스트로젠과 유사한 생리 기능을 하므로 폐경기 여성의 골다공증 예방에 사용된다(20).

선행연구를 통해 식용 가능한 천연물 중에서 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 32종의 천연물을 탐색하였고, 그중 퇴행성관절염 개선 효과가 탁월한 오디, 상엽, 서리태로 오디추출복합물을 제조하여 실험에 사용하였다. 오디추출복합물이 퇴행성관절염에 대한 개선 효과를 동물모델과 임상 시험을 통해 선행연구로 보고하였으며(21-23), 본 연구에서는 이전의 동물모델에서 염증 지표들을 살펴본 것 외에 오디추출복합물이 monosodium iodoacetate(MIA)로 유도된 퇴행성관절염 동물모델의 연골 분해 정도와 통증, 그리고 급성 염증에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

오디추출복합물(mulberry extract complex, MEC)의 제조는 선행연구 방법(21-23)에 따라 수득하였다. 즉, 오디는 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1 kg 구입하여 생과를 분쇄기에 분쇄한 후 3배(w/v)의 40% 에탄올을 가하여 50°C에서 4시간 추출하였다. 추출과 냉각을 3회 실시하고 Whatman No. 2 filter paper로 여과한 후 60°C에서 60 Brix가 될 때까지 감압 농축하여 동결 건조하였다.

상엽은 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1 kg 구입하여 세척한 다음 50°C에서 24시간 동안 건조하여 분쇄기에 분쇄한 후 4배(w/v)의 50% 에탄올을 가하여 60°C에서 4시간 추출하였다. 추출과 냉각을 3회 실시하고 Whatman No. 2 filter paper로 여과한 후 60°C에서 30 Brix가 될 때까지 감압 농축하였다. 이 농축액을 동결 건조하여 얻어진 분말을 사용하였다.

서리태(*Glycine max* (L.) Merr.)는 경상남도 함양농협에서 1 kg을 구입하여 세척 후 4배(w/v)의 30% 에탄올을 가하여 60°C에서 4시간 추출하였다. 추출과 냉각을 3회 실시하고 Whatman No. 2 filter paper로 여과한 후 60°C에서 30 Brix가 될 때까지 감압 농축하였다. 이 농축액을 동결 건조하여 서리태 추출분말을 얻었다.

오디, 상엽, 서리태의 항염증 효과를 나타내는 물질들의 농도를 고려하여 오디추출물(anthocyanin ca. 1%): 상엽추

출물(rutin ca. 1%): 서리태추출물(isoflavone ca. 0.2%)= 70:14:16의 중량비로 혼합하여 MEC를 제조하였다(22).

퇴행성관절염 동물모델

본 연구의 동물실험은 수원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(USW-IACUC-EDU-2015-07-01)을 받고 시작되었다. 7주령의 흰쥐[Sprague Dawley(SD) rat, 샘타코(주), Seoul, Korea] 40마리를 군당 8마리씩 5그룹으로 나누어 cage에 각각 넣고 일주일 동안 안정화했다. 사육실 온도는 22.1±1°C, 상대습도는 55±5%로 유지하고 명암은 12시간 주기(07:00~19:00)를 유지하면서 사료와 식수를 자유 급여하는 방식으로 사육하였다.

안정화 기간이 끝난 뒤 Janusz 등의 방법(24)과 Na 등의 방법(25)을 참고하여 실험을 진행하였다. 즉, 흰쥐의 오른쪽 무릎 관절 주변을 깨끗이 제모한 후 관절강 내에 MIA(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.85% 생리식염수에 녹여 50 µL(40 mg/mL)씩 주입하여 퇴행성관절염을 유도하였고 정상(Sham)군에는 MIA 대신 동량의 생리식염수를 주입하였다. 24시간 후부터 Table 1에 나타낸 바와 같이 8주간 매일 일정한 시간에 동량의 정제수, 정제수에 녹인 MEC 혹은 ibuprofen을 경구 투여하였다. 항관절염 효과가 있는 약물인 ibuprofen을 양성대조군으로 사용하였다.

연골의 GAG, collagen 측정

8주간의 식이가 끝난 후 흰쥐를 12시간 절식시키고 에테르로 마취시킨 다음 희생시켜 오른쪽 무릎 연골을 적출하였다. 연골 무게 10배량의 PBS(phosphate buffered saline; NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, KH₂PO₄ 1.8 mmol/L; pH 7.4)를 첨가하여 Homogenizer (Omni homogenizer 17505, Omni International Inc., Warrenton, VA, USA)로 균질화한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(MX-300, Tomy, Tokyo, Japan) 하여 상층액을 얻었다. 이 상층액의 glycosaminoglycan(GAG)의 농도는 Mybiosource사(San Diego, CA, USA)의 ELISA kit을 사용하여 Microplate spectrophotometer(Epoch, Biotek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 측정하여 얻었다.

Collagen의 농도는 위에서 얻어진 시료 100 µL와 6 N HCl 100 µL를 각 well에 넣고 121°C에서 3시간 가수분해한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(MX-300, Tomy) 하여 BioVision사(San Francisco, CA, USA)의 hydrox-

Table 1. Induction of degenerative arthritis by monosodium iodoacetate (MIA) and oral dose of sample

Groups	Induction of arthritis	Oral dose of sample/d (for 8 weeks)	Number of animals
Sham	Treated with saline	Distilled water (1 mL)	8
Negative control		Distilled water (1 mL)	8
Positive control	Treated with MIA	Ibuprofen 20 mg/kg body weight (1 mL)	8
MEC ¹⁾ 400	(40 mg/mL, 50 µL/rat)	MEC 400 mg/kg body weight (1 mL)	8
MEC 800		MEC 800 mg/kg body weight (1 mL)	8

¹⁾Mulberry extract complex.

ypoline colorimetric assay kit으로 560 nm에서 측정하여 얻었다. Standard로 사용한 hydroxyproline의 비율은 collagen의 아미노산 조성 중 평균 110잔기/1,000잔기이므로 시료 중 collagen 농도는 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Collagen 농도}(\mu\text{g}/\text{mg protein}) = \left[\frac{\text{(hydroxyproline amount/sample volume)} \times \text{sample dilution}}{9.09} \right] / \text{연골단백질 농도}$$

혈중 MMP-2, 9, 13 측정

관절염 동물모델에서 채취한 혈액을 상온에서 30분 이상 방치한 후, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(MX-300, Tomy) 하여 혈청을 분리하였다. 이렇게 얻어진 혈청 시료로 ELISA kit(Cusabio, Hubei, China)을 이용하여 연골 염증성 인자인 matrix metalloproteinase(MMP)-2, 9, 13의 농도를 측정하였다. 먼저 혈청(혹은 표준물질) 100 μL 를 각 well에 분주한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 시료를 제거한 후 100 μL 의 biotin-antibody를 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 3번 세척하였다. 100 μL 의 HRP(horse-radish peroxidase)-avidin을 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 5번 세척 후, 90 μL 의 TMB(tetramethylbenzidine) substrate를 첨가하여 빛을 차단한 상태로 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 50 μL 의 stop solution (1 N sulfuric acid)으로 반응을 종료시켰다. Microplate spectrophotometer(Epoch, Biotek)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈중 COMP, CTX-2 측정

관절염 동물모델의 혈청을 이용하여 혈중 cartilage oligomeric matrix protein(COMP)과 C-terminal telopeptide 2(CTX-2)를 측정하였다. COMP와 CTX-2는 Mybio-source사의 ELISA kit을 사용하였다.

즉, COMP를 측정하기 위해서 혈청(혹은 표준물질) 50 μL 를 각 well에 분주하고 100 μL 의 HRP-conjugated reagent를 가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응액을 모두 제거하고 4번 세척한 다음 Chromogen solution A와 B를 각각 50 μL 씩 첨가하여 빛을 차단한 상태로 37°C에서 15분간 반응시킨 후 50 μL 의 stop solution을 가하여 반응을 종료시켰다. Microplate spectrophotometer(Epoch, Biotek)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CTX-2를 측정하기 위해서 혈청(혹은 표준물질) 100 μL 를 각 well에 분주하고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 100 μL 의 biotin-antibody를 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. Biotin-antibody를 제거하고 100 μL 의 HRP-avidin을 각 well에 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 90 μL 의 TMB substrate를 첨가하여 빛을 차단한 상태로 37°C에서 15분간 반응시키고 50 μL 의 stop solution을 가하여 반응을 종료시켰다. Microplate spectrophotometer(Epoch, Bio-

tek)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈중 CRP 측정

MIA로 퇴행성관절염이 유도된 흰쥐의 혈청을 분리하여 C-reactive protein(CRP)을 Biovision사의 ELISA kit을 사용하여 측정하였다. 즉, 혈청(혹은 표준물질) 100 μL 를 각 well에 넣고 상온에서 2.5시간 반응시킨 후 100 μL 의 biotin-antibody를 가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 모두 제거하고 100 μL 의 streptavidin을 가하여 상온에서 45분간 반응시킨 후 100 μL 의 TMB substrate를 가하여 빛을 차단한 상태로 상온에서 30분간 반응시켜 발색 반응을 유도하였다. 50 μL 의 stop solution을 가하여 반응을 종료시켰으며 microplate spectrophotometer(Epoch, Biotek)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Severity score

관절염 지수를 평가하기 위하여 퇴행성관절염 동물모델을 희생하기 전 육안으로 3명의 실험자가 각각 평가하였다. 평가는 Kim 등(26)의 방법을 변형하여 3명의 실험자가 3회 독립 관찰하여 각각 1점에서 5점으로 점수를 배점하여 평균값으로 표시하였다(Table 2).

Xylene으로 유도된 귀 부종에 대한 억제 효과

Xylene으로 귀 부종을 유도하는 방법은 Atta와 Alkofahi의 방법(27)을 수정하여 실행하였다. 4주령 수컷 생쥐(ICR mice)를 일주일간 안정화한 후 대조군(DW), 양성대조군(ibuprofen 20 mg/kg), MEC군(200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg) 등 5그룹(n=8)으로 나누어 xylene을 도포하기 1시간 전에 경구 투여하였다. Xylene 30 μL 를 오른쪽 귀의 뒷면에 도포하여 급성염증을 유발하였고 왼쪽 귀에는 도포하지 않았다. Xylene을 처리하고 2시간 후 실험동물들 모두 희생시켰으며 편치로 양쪽 귀에서 지름 6 mm 원을 잘라 중량을 측정하였다. 오른쪽 귀와 왼쪽 귀의 중량 차이를 비교하여 부종 정도를 정의하였다. 부종 억제 효과는 대조군과 비교하여 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{부종 억제율}(\%) = \frac{(Rc - Lc) - (Rt - Lt)}{(Rc - Lc)} \times 100$$

Rc: 대조군의 오른쪽 귀 중량

Table 2. Clinical evaluation of arthritis

Grade	Clinical symptom
1	No change
2	Mild erythema of the ankle joint
3	Mild swelling and erythema of the ankle joint
4	Moderate swelling and erythema of the ankle joint through the metatarsal bone
5	Severe swelling and erythema of the ankle joint through the digit

Lc: 대조군의 왼쪽 귀 중량
 Rt: 양성대조군 혹은 MEC군의 오른쪽 귀 중량
 Lt: 양성대조군 혹은 MEC군의 왼쪽 귀 중량

통계 분석

실험 결과는 3회 반복하여 평균±표준편차(mean±SD)로 나타냈으며, SPSS(IBM SPSS Statistics 21, Armonk, NY, USA)를 사용하여 ANOVA(Scheffe test)로 통계적 유의성이 있는지 판단하였다($P<0.05$).

결과 및 고찰

연골의 GAG, collagen 측정

관절을 구성하는 조직의 주요 성분인 단백다당(proteoglycan)은 core 단백질에 한 개에서 여러 개에 이르는 GAG가 공유 결합하여 있는 대표적 세포외기질(extracellular matrix) 물질이다. GAG는 amino sugar를 포함하여 반복하는 이당류(disaccharide)로 구성되어 있으며, 이당류는 최소한 한 개의 음전하를 띠는 carboxyl 혹은 sulfate group을 가지고 있다. 관절 연골에서 주로 발견되는 GAG에는 hyaluronic acid, chondroitin sulfate, keratan sulfate 그리고 dermatan sulfate 등이 포함된다. 이러한 분자들의 연골 내 농도는 나이, 손상의 정도 및 질병의 상태에 따라서 다양하다(28). 퇴행성관절염이 진행될수록 GAG가 분해되어 그 농도가 감소하는데, 실험을 통해 MEC가 MIA로 유도된 퇴행성관절염 동물모델의 연골에서 GAG 분해에 대한 억제 여부를 확인하였다. 그 결과 정상군(Sham)에서 27.51 ± 4.69 ng/mg total protein으로 측정되었고, 대조군(DW)에서는 21.47 ± 2.54 ng/mg total protein으로 연골의 GAG 농도가 MIA로 퇴행성관절염을 유도한 군에서 감소하였다(Fig. 1). Ibuprofen, MEC 400 mg/kg, 800 mg/kg군에서는 각각 29.13 ± 4.35 ng/mg total protein, 28.64 ± 3.47 ng/mg total protein, 그리고 31.56 ± 3.80 ng/mg total protein으로 대조군(DW)에 비해 GAG 농도가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 MEC의 농도 의존적으로 GAG 농도가 증가하였다. 이는 MIA로 유도된 퇴행성관절염 동물모델에서 MEC에 의해 GAG 분해가 억제되는 것을 의미한다.

연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 특히 가교 형성의 결합조직 강도를 유지하는 데 필요한 성분으로 연골의 틀을 유지하는 데 기여한다(29). 퇴행성관절염은 단백질 가수분해효소, 여러 염증 유발 cytokines, 그리고

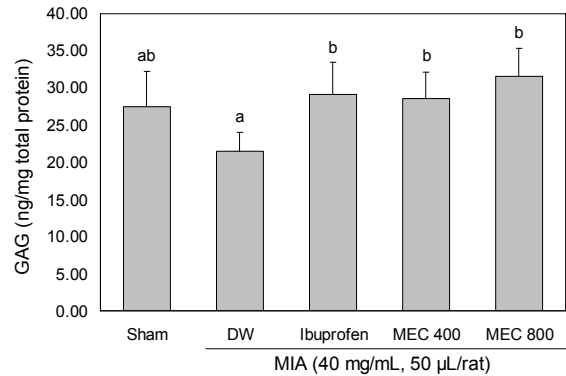


Fig. 1. Effects of mulberry extract complex (MEC) on concentrations of glycosaminoglycan in animal model of degenerative arthritis. All data are presented as mean±SD. Different letters (a,b) above the bars denote statistically significant differences ($P<0.05$). Sham: Normal SD-rat group, DW: MIA-induced degenerative arthritis group, Ibuprofen: MIA-induced degenerative arthritis group treated with ibuprofen 20 mg/kg body weight, MEC 400: MIA-induced degenerative arthritis group treated with MEC 400 mg/kg body weight, MEC 800: MIA-induced degenerative arthritis group treated with MEC 800 mg/kg body weight, respectively.

nitric oxide의 발생 등으로 인해 유발되는데, 이러한 인자들은 연골 조직의 퇴화에 중추적인 역할을 하고 있다. 특히 MMPs의 증가는 연골을 구성하는 collagen matrix를 손상해 퇴행성관절염을 악화시키는 것으로 많이 알려졌다(30). 본 실험에서는 MIA 유도 후 연골 조직 내의 collagen 농도의 변화를 측정하였다. 그 결과 collagen 농도는 정상군(Sham)에서 5.97 ± 1.03 µg/mg total protein, 대조군(DW)에서 4.55 ± 0.95 µg/mg total protein으로 대조군(DW)의 collagen 농도가 정상군(Sham)보다 감소하여 관절염이 유발된 것을 확인할 수 있었다(Table 3). Ibuprofen, MEC 400 mg/kg, 800 mg/kg을 각각 투여한 군에서는 4.59 ± 0.74 µg/mg total protein, 5.05 ± 0.59 µg/mg total protein, 5.78 ± 0.92 µg/mg total protein으로 각각 측정되었다. MEC 400 mg/kg, 800 mg/kg 군에서 collagen 농도가 대조군보다 증가하였으며 특히 MEC 800 mg/kg 군에서는 정상군의 수준으로 회복되었고, 유의적인 차이는 없지만 Ibuprofen 군보다 높은 효과를 나타내었다.

이러한 결과로 보아 MEC가 연골을 구성하는 GAG와 collagen이 관절염으로 인해 파괴되는 것을 억제하고 회복시키는 효과가 있을 것으로 생각되며, GAG와 collagen을 분해하는 MMPs가 MEC에 의해 영향을 받는지를 확인하기

Table 3. Effects of MEC on concentrations of collagen in animal model of degenerative arthritis

	Sham	DW	Ibuprofen	MEC 400	MEC 800
Collagen (µg/mg total protein)	5.97 ± 1.03^{NS}	4.55 ± 0.95	4.59 ± 0.74	5.05 ± 0.59	5.78 ± 0.92

All data are presented as mean±SD.
 NS: Not significant.
 Groups are the same as in Fig. 1.

위해 다음 실험을 하였다.

혈중 MMP-2, 9, 13 측정

퇴행성관절염에서 관절질환의 주요 원인은 관절연골의 세포외기질 분해 때문이다. MMPs는 세포외기질을 분해하는 작용을 하는데, 이는 collagenase, stromelysin, gelatinase 등으로 구성되어 있다(31). 퇴행성관절염이 발병하면 연골세포의 collagen 생성이 저해되고 MMPs의 생성이 증가하여 주변 조직이 파괴되는데(32), MMPs의 증가는 심각한 연골 손상을 불러일으킬 수 있다. 실제로 MMP-2, MMP-9는 퇴행성관절염에서 농도가 증가하는 주요한 인자로 알려졌다으며, MMP-13의 경우 Type 2 collagen의 분해효소로 관절연골의 콜라겐 생성 및 재생에 중요한 인자로 알려졌다(30). 본 실험에서는 MIA로 퇴행성관절염을 유도한 동물모델에 MEC를 8주간 경구 투여한 후 혈중 MMP-2, MMP-9, MMP-13의 농도를 측정하였다.

MMP-2의 농도를 측정한 결과, MIA로 유도한 대조군(DW)이 정상군(Sham)에 비해 MMP-2의 농도가 0.65 ± 0.11 ng/mL에서 0.88 ± 0.10 ng/mL로 증가하였고, MEC를 투여한 결과 MEC 400 mg/kg에서 0.84 ± 0.13 ng/mL, MEC 800 mg/kg에서 0.72 ± 0.10 ng/mL로 농도 의존적으로 다시 감소하였다(Fig. 2). Ibuprofen 군 역시 0.79 ± 0.11 ng/mL로 감소하였지만 MEC 800 mg/kg 군보다는 효과가 낮았다.

MMP-9의 농도를 측정한 경우 정상군(Sham)에서는 0.45 ± 0.06 ng/mL, MIA로 유도한 대조군(DW)에서는 0.68 ± 0.06 ng/mL였고, ibuprofen을 투여한 군에서는 0.56 ± 0.05 ng/

mL, MEC 400 mg/kg을 투여한 군에서는 0.52 ± 0.03 ng/mL, MEC 800 mg/kg을 투여한 군에서는 0.48 ± 0.04 ng/mL로 통계적으로 유의한 감소가 나타났다. MEC 투여군의 경우 정상군과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 Ibuprofen 군에 비해 MMP-9를 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

혈중 MMP-13의 농도는 대조군(DW)이 0.40 ± 0.05 ng/mL로 정상군(0.30 ± 0.04 ng/mL)보다 유의적으로 높게 나타났다. MEC 400 mg/kg 투여군은 혈중 MMP-13의 농도가 0.37 ± 0.01 ng/mL로 나타났고, MEC 800 mg/kg 투여군도 동일하게 0.37 ± 0.01 ng/mL로 나타나 두 군 모두 대조군에 비해 다소 낮은 경향을 보였지만 농도 간의 차이는 없었다.

Sim 등(33)은 MIA로 유도한 흰쥐에게 난각막 효소 분해물인 난각막추출물(NEM)을 투여한 후 MMP-2, MMP-9의 생성량을 측정한 결과 농도 의존적으로 유의적인 감소를 했다고 하였고, An과 Heo(34)의 계지인삼탕, Lee와 Oh(35)의 건보단, Lee와 Oh(36)의 마황부자세신탕은 모두 MMP-9의 생성을 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. MEC 역시 대조군보다 MMP-2, 9, 13의 농도가 감소하는 결과로 이들의 생성을 억제함으로써 연골세포조직의 파괴를 감소하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

혈중 COMP, CTX-2 측정

COMP와 CTX-2는 연골을 구성하는 Type 2 collagen의 분해산물로 연골의 퇴행, 손상 및 그 진행 여부의 진단에 자주 활용되고 있다(31). MEC가 연골 손상 및 골관절염 지

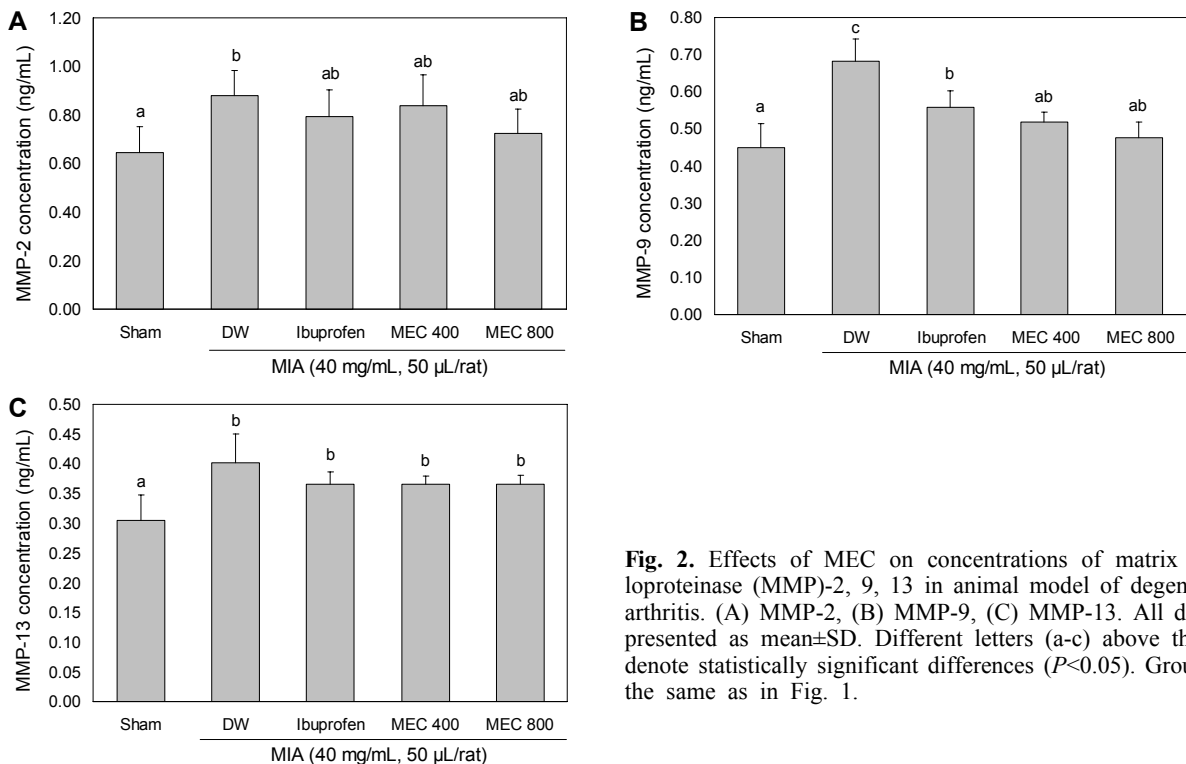


Fig. 2. Effects of MEC on concentrations of matrix metalloproteinase (MMP)-2, 9, 13 in animal model of degenerative arthritis. (A) MMP-2, (B) MMP-9, (C) MMP-13. All data are presented as mean±SD. Different letters (a-c) above the bars denote statistically significant differences ($P < 0.05$). Groups are the same as in Fig. 1.

Table 4. Effect of MEC on concentrations of COMP¹⁾ and CTX-2²⁾ in animal model of degenerative arthritis

	Sham	DW	Ibuprofen	MEC 400	MEC 800
COMP (ng/mL)	51.25±4.98 ^a	85.89±13.06 ^c	62.45±6.80 ^{ab}	73.44±12.32 ^{bc}	65.57±14.38 ^{ab}
CTX-2 (pg/mL)	233.29±76.63 ^a	1,372.73±181.09 ^c	1,060.75±135.46 ^b	934.41±154.36 ^b	867.37±160.82 ^b

¹⁾COMP: cartilage oligomeric matrix protein. ²⁾CTX-2: C-terminal telopeptide 2.

All data are presented as mean±SD.

Different letters (a-c) within a row denote statistically significant differences ($P<0.05$).

Groups are the same as in Fig. 1.

Table 5. Effect of MEC on concentrations of C-reactive protein (CRP) in animal model of degenerative arthritis

	Sham	DW	Ibuprofen	MEC 400	MEC 800
CRP (µg/mL)	1,510.59±130.94 ^{NS}	1,637.20±119.50	1,670.00±199.94	1,682.09±129.73	1,580.23±70.17

All data are presented as mean±SD.

NS: Not significant.

Groups are the same as in Fig. 1.

표에 미치는 영향을 측정하기 위하여 연골의 분해산물인 COMP와 CTX-2를 측정하여 Table 4에 나타내었다. COMP의 농도를 측정한 결과, 정상군(Sham)은 51.25±4.98 ng/mL로 나타났고 대조군(DW)은 85.89±13.06 ng/mL로 나타나 대조군이 정상군보다 유의적으로 높았다. 한편, ibuprofen과 MEC(800 mg/kg) 투여군은 각각 62.45±6.80 ng/mL, 65.57±14.38 ng/mL로 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다.

혈중 CTX-2의 생성량을 측정한 결과, 대조군(DW)은 1,372.73±181.09 pg/mL로 정상군(233.29±76.63 pg/mL)보다 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 MIA 투여로 인해 연골이 분해되어 CTX-2의 생성량이 증가한 것으로 생각된다. MEC(400 mg/kg, 800 mg/kg) 투여군의 혈중 CTX-2 농도는 각각 934.41±154.36 pg/mL, 867.37±160.82 pg/mL로 대조군보다 유의적으로 낮은 결과를 보였다.

Sim 등(33)은 MIA로 골관절염을 유도한 흰쥐에게 난각 막추출물을 52 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg의 농도로 6주간 투여하였을 때 400 mg/kg 투여군이 혈중 COMP 생성을 유의적으로 억제했다고 보고하였고, 모든 투여농도에서 혈중 CTX-2 농도를 대조군보다 유의적으로 감소시켰다고 보고한 바 있어 본 연구의 결과와 비슷하였다.

혈중 CRP 측정

CRP는 pentraxin 패밀리의 단백질로서 염증반응의 비특이적 marker로 사용되고 있는 급성기반응단백질(acute phase reactive protein)이다(37). 각 그룹의 혈청 중 CRP 농도를 측정하여 Table 5에 나타내었다. 정상군(Sham)의 CRP 농도는 1,510.59±130.94 µg/mL, 대조군(DW)은 1,637.20±119.50 µg/mL로 정상군보다 다소 높게 나타났으며, 양성 대조군(Ibuprofen)의 경우 1,670.00±199.94 µg/mL로 나타났다. MEC 투여군의 경우 400 mg/kg 섭취군에서 1,682.09±129.73 µg/mL, 800 mg/kg 섭취군에서 1,580.23±70.17 µg/mL로 측정되었는데 각 섭취군 간 유의적인 차이는 없었

다. Mohan 등(38)은 MIA로 골관절염이 유도된 흰쥐의 유도 전, 후 2주, 6주, 10주에 측정된 혈중 CRP 농도가 모두 유의적인 차이가 없었다고 보고하여 본 연구의 결과와 비슷하였다. Lee 등(32)은 MIA로 골관절염이 유도된 흰쥐에게 가미계작지모탕을 투여한 후 혈청 내에서 표준 CRP보다 낮은 농도의 해당 단백질을 보다 정밀하게 검출할 수 있는 방법인 hs-CRP(High sensitivity-CRP)를 사용하여 측정하였는데, 대조군보다 hs-CRP 농도가 감소하였으나 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

Severity score

퇴행성관절염 유발 동물모델에서 나타나는 퇴행성관절염에 대한 MEC의 효과를 확인하기 위해 관절염 정도를 평가하였다. 그 결과 MIA 유도를 하지 않은 정상군(Sham)에서는 관절의 특이한 증상이 관찰되지 않았으며, MIA 유도를 한 대조군(DW)에서는 퇴행성관절염을 유도한 오른쪽 다리에서 홍반과 부종을 동반한 증상이 관찰되어 높은 점수인 4.38±0.45점으로 측정되었다(Fig. 3). Ibuprofen을 투여한

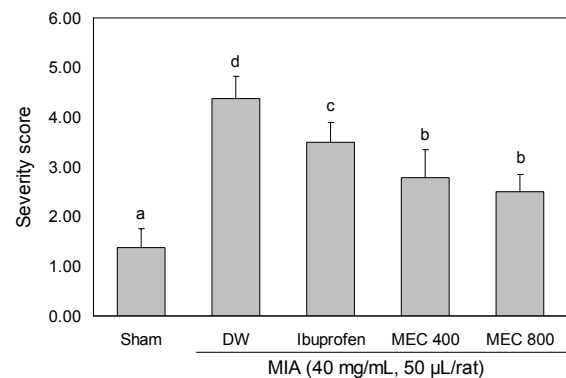


Fig. 3. Effects of MEC on severity score in animal model of degenerative arthritis. All data are presented as mean±SD. Different letters (a-d) above the bars denote statistically significant differences ($P<0.05$). Groups are the same as in Fig. 1.

Table 6. Effect of MEC on xylene induced ear edema in mice

Treatment	Ear weight difference (mg)	Inhibition rate (%)
Control (DW)	8.26±1.57 ^a	—
Ibuprofen (20 mg/kg)	4.04±0.63 ^b	51.04±7.65 ^a
MEC (200 mg/kg)	3.86±1.04 ^b	53.25±12.60 ^a
MEC (400 mg/kg)	3.39±1.00 ^b	58.96±12.12 ^a
MEC (800 mg/kg)	2.83±0.45 ^b	65.70±5.48 ^a

All data are presented as mean±SD.

Different letters (a,b) within a column denote statistically significant differences ($P<0.05$).

그룹에서는 관절염 지수가 3.50 ± 0.40 으로 대조군보다 유의적으로 감소하였고, MEC 400 mg/kg, 800 mg/kg을 투여한 그룹에서는 관절 부근에 경미한 홍반과 부종이 관찰되어 관절염 지수가 각각 2.79 ± 0.56 , 2.50 ± 0.36 으로 대조군보다 유의적으로 감소하였다. Ibuprofen보다 MEC를 투여한 그룹에서 관절염 지수가 유의적으로 낮아 MEC가 관절염 개선에 더 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. Kim 등(26)은 collagen으로 관절염을 유도하여 28일 후 관절염 지수를 측정된 결과 가시오가피와 양파혼합물 600 mg/d를 투여한 군이 대조군보다 관절염 지수가 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. Jung 등(39)은 collagen으로 관절염을 유도하여 42일째 관찰한 결과 진피를 50 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 투여한 군에서 관절염 지수가 음성대조군보다 감소하는 경향을 보였으나 양성대조군인 Indomethacin 투여군에서도 감소하는 경향을 보여 진피 투여군과 양성대조군 간에 유의적인 차이는 없었다고 보고하였다.

Xylene 유도 급성염증 동물모델 제작 및 귀 부종실험

급성염증에 대한 억제 효과를 평가하기 위하여 xylene에 의한 귀 부종 유도 실험을 진행하였다. Ibuprofen은 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)로, 본 실험에서 양성대조군으로 사용되었다. Xylene 도포 후 대조군의 오른쪽 귀는 도포하지 않은 좌측에 비해 현저한 부종이 관찰되었으며 희생 후 측정된 중량에서도 현저한 차이를 나타내었다(Table 6). 양성대조군인 Ibuprofen 군은 20 mg/kg으로 투여하였을 때 xylene에 의한 부종을 51.04% 억제하였고, MEC는 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg의 농도로 경구 투여하였을 때 농도 의존적으로 xylene에 의해 유도된 귀 부종을 억제하였다.

Atta와 Alkofahi(27)는 알로에베라(*A. vera*)를 200 mg/kg의 농도로 마우스에 경구 투여하였을 때 xylene에 의한 귀 부종을 억제하지 못했지만(0%), 400 mg/kg의 농도로 투여하였을 때 71%의 억제율을 나타냈다고 보고하였다. 또한 박하(*M. piperita*)는 200 mg/kg과 400 mg/kg의 농도에서 각각 49%, 50%의 억제율을 나타내어 시료 농도 간 비슷한 억제율을 나타냈다고 보고한 바 있는데, MEC는 농도별로 유의적인 차이는 없었지만 53.25%(200 mg MEC/kg), 58.96%(400 mg MEC/kg), 65.70%(800 mg MEC/kg)로

억제율이 점차 증가하는 경향을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 오디추출복합물(mulberry extract complex, MEC)의 퇴행성관절염 증상 완화 및 개선 효과 가능성을 탐색하기 위하여 monosodium iodoacetate(MIA)로 유도한 퇴행성관절염 *in vivo* 실험모델을 이용하였다. 연골의 주요 구성성분인 glycosaminoglycan(GAG) 및 collagen의 농도를 실험동물의 연골에서 측정된 결과 MIA로 인해 감소하였던 GAG 및 collagen의 농도가 MEC를 경구 투여한 실험군에서 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 교원질 합성을 억제하고 분해를 촉진하는 matrix metalloproteinase-2, 9, 13의 농도를 측정된 결과는 MEC의 농도에 따라 감소하는 결과를 보여주었다. 연골 손상 지표인 cartilage oligomeric matrix protein과 C-terminal telopeptide 2의 측정 결과에서는 대조군보다 유의성 있는 감소를 나타내어 MEC가 퇴행성관절염의 진행 억제에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 관절염 지수 평가에서도 MEC는 모든 농도에서 대조군보다 유의성 있게 개선되는 결과를 나타내었다. 이상의 실험 결과를 통하여 MEC가 퇴행성관절염에서 나타나는 연골 구성성분의 분해를 억제하고, 여러 중요한 퇴행성관절염 진행 인자를 효과적으로 억제하여 결국 연골과괴 감소와 더불어 통증을 줄여줌으로써 퇴행성관절염에 대한 증상 완화 및 개선 효과가 있을 수 있는 건강기능식품의 원료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 “식품 기능성평가 지원사업”의 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. MOHW. 2014. *Senior survey 2014*. Ministry of Health and Welfare, Sejong, Korea. p 311.
2. Chang MC, Hung SC, Chen WY, Chen TL, Lee CF, Lee HC, Wang KL, Chiou CC, Wei YH. 2005. Accumulation of mitochondrial DNA with 4977-bp deletion in knee cartilage—an association with idiopathic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 1004-1011.
3. van der Kraan PM, van den Berg WB. 2008. Osteoarthritis in the context of ageing and evolution: loss of chondrocyte differentiation block during ageing. *Ageing Res Rev* 7: 106-113.
4. Yeom HE. 2013. Symptoms, aging-stereotyped beliefs, and health-promoting behaviors of older women with and without osteoarthritis. *Geriatr Nurs* 34: 307-313.
5. MOHW. 2013. *Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2013*. Ministry of Health and Welfare, Sejong, Korea. p 63.
6. Kim HA. 2007. The management of arthritis. *J Korean Med Assoc* 50: 743-750.

7. Park SW, Jung YS, Ko KC. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Korean Soc Hort Sci* 38: 722-724.
8. Kim HB, Kim SL. 2003. Identification of C3G (cyanidin-3-glucoside) from mulberry fruits and quantification with different varieties. *Korean J Seric Sci* 45: 90-95.
9. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberries from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1467-1475.
10. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. 2003. The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Science and Industry* 36(3): 49-60.
11. Kim MH, Ko KC, Lim SH, Yu YS. 1980. Study on the usability of mulberry fruit. Fruit characteristics of mulberry. *Coll Agric Bull SNU* 5: 221-223.
12. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. 1996. A study of the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107.
13. Lee SH, Kim GH. 2008. Inhibitory effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine pulmonary artery endothelial cells. *J Life Sci* 18: 653-659.
14. Niidome T, Takahashi K, Goto Y, Goh S, Tanaka N, Kamei K, Ichida M, Hara S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. 2007. Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport* 18: 813-816.
15. Pirvulescu MM, Gan AM, Stan D, Simion V, Calin M, Butoi E, Tirgoviste CI, Manduteanu I. 2011. Curcumin and a *Morus alba* extract reduce pro-inflammatory effects of resistin in human endothelial cells. *Phytother Res* 25: 1737-1742.
16. Park JS, Park CH, Jun CY, Choi YK, Hwang GS, Kim DW. 2007. The anti-diabetes and vasoelasticity effects *Mori Folium* and *Aurantii Fructus* in streptozotocin induced type II diabetes mellitus model. *Korean J Orient Int Med* 28: 544-559.
17. Kim OG, Jeong JC. 2006. Effects of *Mori folium* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Orient Int Med* 27: 811-821.
18. Bae MJ, Ye EJ. 2010. Antioxidant activity and *in vitro* anticancer effects of manufactured fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 796-804.
19. Kim HJ, Kim JK, Whang WK, Ham IH, Kwon SH, Bo SH, Kim HJ. 2003. Effects of *Mori folium* and *Crataegus pinnatifida* leaf extracts on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji* 47: 206-211.
20. Oh HS, Park YH, Kim JH. 2002. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice soybeans. *Korean J Food Sci Technol* 34: 498-504.
21. Seo HH, Jeong JM. 2013. Beneficial effects of phyto-extract complex (CME) on degenerative arthritis. *Kor J Herbology* 28: 87-93.
22. Seo HH, Jeong JM. 2014. Inhibitory effects of complex of mulberry extract on degenerative arthritis. *Korean J Med Crop Sci* 22: 262-269.
23. Kim JK, Ha JK, Li H, Jeong JM. 2015. Animal and clinical study of the efficacy of mulberry extract complex on degenerative arthritis. *Kor J Herbol* 30: 25-34.
24. 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.
25. Na JY, Song KB, Kim SH, Kwon YB, Kim DG, Lee JK, Jo HK, Kwon JK. 2014. Effects of HPL-04 on degenerative osteoarthritis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 30-39.
26. Kim KY, Sim KC, Kim GY, Choi CH, Jung JG, Chung JS, Jeong HW. 2011. Effects of *Acanthopanax senticosus* and onion mixture extract on the collagen-induced arthritis in rat model. *Korean J Orient Physiol Pathol* 25: 1000-1007.
27. Atta AH, Alkofahi A. 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol* 60: 117-124.
28. Kim JH, Ahn CS. 2009. Basic science of the articular cartilage. *J Korean Arthrosc Soc* 13: 189-192.
29. Kim MH. 2008. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. extract in bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Orient Physiol Pathol* 22: 183-188.
30. Nam DE, Kim OK, Shim TJ, Kim JH, Lee JM. 2014. Effect of *Boswellia serrata* extracts on degenerative osteoarthritis *in vitro* and *in vivo* models. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 631-640.
31. Lee MC, Ji JH, Kim WY, Do JH, Kim YM. 2006. The effects of dehydroepiandrosterone-pyruvate on human osteoarthritic chondrocytes. *J Korean Orthop Res Soc* 9: 153-164.
32. Lee HJ, Park JO, Oh MS. 2015. Anti-inflammation and anti-oxidation effects of *gamikyejakjimo-tang* herbal acupuncture on pathologic factor and MIA-induced osteoarthritis rat. *J Korean Med Rehab* 25: 1-20.
33. Sim BY, Bak JW, Lee HJ, Jun JA, Choi HJ, Kwon CJ, Kim HY, Ruff KJ, Brandt K, Kim DH. 2015. Effects of natural eggshell membrane (NEM) on monosodium iodoacetate-induced arthritis in rats. *J Nutr Health* 48: 310-318.
34. An SS, Heo DS. 2013. Effects of Kyejiinsam-tang in MIA-induced osteoarthritis rats. *J Korean Med* 34: 69-85.
35. Lee EJ, Oh MS. 2014. Effects of *Keonbodan* on MIA-induced osteoarthritis in rat. *J Korean Med Rehab* 24: 51-64.
36. Lee HE, Oh MS. 2014. Effects of *Mahwangbujaseshin-tang* (*Mahuangfuzixixintang*) on MIA-induced osteoarthritis rats. *J Korean Med Rehab* 24: 65-81.
37. Pepys MB, Hirschfield GM. 2003. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805-1812.
38. Mohan G, Perilli E, Kuliwaba JS, Humphries JM, Parkinson IH, Fazzalari NL. 2011. Application of *in vivo* micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 13: R210.
39. Jung JK, Son KH, Kim YS, Park YG. 2011. Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice. *Kor J Herbology* 26: 1-6.