

## 牛膝 등 복합 추출물의 monosodium iodoacetate로 유발한 흰쥐 골관절염에 대한 효과

김명규<sup>1#</sup>, 서일복<sup>1</sup>, 임강현<sup>1\*</sup>, 정태진<sup>2</sup>, 김진석<sup>2</sup>

1 : 세명대학교 한의과대학, 2 : (주)후스타일 부설연구소

### Effects of Achyranthis Japonicae Radix-containing mixture on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats

Myung-Gyou Kim<sup>1#</sup>, Il-Bok Seo<sup>1</sup>, Kang-Hyun Leem<sup>1\*</sup>, Taejin Jeong<sup>2</sup>, Jinseok Kim<sup>2</sup>

1 : College of Korean Medicine, Semyung University

2 : Whostyle Co., Research & Development Center

#### ABSTRACT

**Objectives** : The present study was designed to determine the effects of mixture of Achyranthis Japonicae Radix, Scutellariae Radix, and Acanthopanax Cortex on monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis in rats. The mixture was composed of Achyranthis Japonicae Radix, Scutellariae Radix, and Acanthopanax Cortex extracts.

**Methods** : Arthritis was induced by injection of MIA into knee joints of rats. At the end of experiment, gross examination on the articular structures of knee joints were performed. Proteoglycan (PG) contents in articular cartilages were analysed as well. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) contents in synovial fluids were measured by ELISA method and matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP1) mRNA were measured by a realtime PCR.

**Results** : The surfaces of the articular cartilage were observed. The severity of osteoarthritis in the treated group were alleviated compared with control group. PG contents in articular cartilages of the treated group were increased compared with control group. IL- $1\beta$  contents in synovial fluids of the treated group were significantly decreased compared with control group. MMP2 and MMP9 mRNA contents in articular cartilages were significantly decreased compared with control group and TIMP1 mRNA contents were increased compared with control group.

**Conclusions** : On the basis of these results, we concluded that Achyranthis Japonicae Radix-containing mixture treatment has anti-arthritic effects on the MIA-induced osteoarthritis in rats. And the effects were related with the reduction of IL- $1\beta$  in synovial membranes and the consequent reduction of MMP2 and MMP9 expressions.

**Key words** : Achyranthis Japonicae Radix, Scutellariae Radix, Acanthopanax Cortex, monosodium iodoacetate, osteoarthritis, rat

## I. 서 론

골관절염은 여러 가지 원인에 의해 관절 손상이 유발된 이후, 국소 관절에 점진적인 관절연골의 소실 및 그와 관련된 2

차적인 변화와 증상을 동반하는 질환으로<sup>1)</sup>, 관절 간격 감소, 연골 변화, 통증, 관절변형 및 기능의 악화를 초래한다<sup>2)</sup>.

2013년 국민건강통계에 의하면 남자 50대에서 2.1%, 60대에서 6.5%, 70대 10.4%로, 여자는 50대 7.2%, 60대

\*Corresponding author : Kang-Hyun Leem, College of Korean Medicine, Semyung University.

· Tel : +82-43-649-1341 · E-mail : heavenok@dreamwiz.com

#First author : Myung-Gyou Kim, College of Korean Medicine, Semyung University.

· Tel : +82-43-649-1710 · E-mail : kimmyunggyou@gmail.com

· Received : 9 November 2016 · Revised : 6 January 2017 · Accepted : 15 January 2017

20.8%, 70대 36.1%로 연령이 높아질수록 연령별 골관절염 유병률이 급격히 증가하고 있으며, 향후 노령화에 따른 골관절염 유병률 또한 점차 증가할 것으로 예상된다고 보고하고 있다<sup>3)</sup>.

현재까지 골관절염의 치료목적은 관절의 구조적 손상을 억제 또는 회복시키는 방향이 아니고 증상완화에 초점을 맞추어 통증을 줄이고, 질병의 진행을 지연, 관절의 기능과 삶의 질을 유지시키는데 목적이 있었다. 그러나, 최근 골관절염의 병인에 대한 연구가 진행되어 짐에 따라 병의 진행을 차단하거나 지연시키고, 연골 손상을 회복시킬 수 있는 새로운 치료법들을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>4)</sup>.

한의학에서 골관절염의 병태생리는 筋骨, 肌肉, 肢體, 關節 등에 疼痛, 重着, 麻木, 關節腫脹, 屈伸不利, 發赤, 및 熱感 등 증상이 발생하는 痺病證의 범주에 포함되며, 치료에도 주로 痺證 治療法을 사용하고 있다<sup>5)</sup>. 關節痺症은 인체의 營衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱 한 경우 風寒濕熱의 邪氣가 체내에 침입하여 관절에 응체됨으로써 발생하는데, 祛邪를 목표로 하는 치료법과 함께 營衛를 調節하고 氣血을 補益하는 법을 병행해야 한다.

본 실험의 선행 연구에서 牛膝, 黃芩, 五加皮 복합 추출물 (*Achyranthis Japonicae Radix*, *Scutellariae Radix*, and *Acanthopanax Cortex*; henceforth ASA)은 活血消腫, 清熱燥濕, 補肝腎 強筋骨 효능을 가진 약물로 구성된 痺證에 활용할 수 있는 복합방으로, 실험적으로도 RAW264.7 세포에 대한 우수한 항염증 효능을 확인하였다<sup>6)</sup>. 이에 본 논문에서는 monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 골관절염 초기 모델에 ASA를 투여하여 체중 변화, 슬관절 내부의 조직변화, 관절연골의 proteoglycan (PG) 함유율 변화, 활액 내 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 함량 변화, 및 관절 연골의 matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP9, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)1 mRNA 변화를 측정하여 골관절염 동물모델에 대한 ASA의 효과를 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

체중 250 ~ 300 g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 (샘타코, 한국)를 구입하여 세명대학교 청정동물사육실 (온도  $23 \pm 1$  °C, 습도  $55 \pm 5$  %, 12시간 주기 명암)내에서 1주일 간 실험실 환경에 적응시키고, 실험에 사용하였다. 실험기간동안 사료 (제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다. 본 동물 실험계획은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실시하였다 (승인번호 smecae 15-10-01).

#### 2) 관절연골손상 유발

관절연골손상은 Janusz 등<sup>7)</sup>의 방법에 준하여 유발하였다. Monosodium iodoacetate (MIA) (Sigma, USA)를 멸균 생리 식염수 (대한약품공업, 한국)에 5 mg/ml의 농도로 용해하여

MIA 주사액을 제조하였다. 실험 개시일에 에테르로 실험동물을 가볍게 마취시키고 양측 슬관절의 전면을 소독용 프로필 알콜로 소독한 후, 슬관절강 내로 각각 MIA 용액 0.1 ml을 주사하여 관절연골손상을 유발하였다.

### 3) 검액의 제조

ASA는 후스타일 (한국)에서 제조한 추출물 (牛膝:黃芩:五加皮 = 1:1:1, 70% 에탄올 추출)을 제공받아 사용하였으며, 냉장 보관한 시료를 사용 당일 아침에 증류수에 각각 20 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg의 용량으로 투여하기 위해 각각 4 mg/ml, 20 mg/ml 100 mg/ml로 용해한 후, 실험동물 체중 당 5 ml/kg의 양으로 경구투여하였다. 양성대조군으로 사용한 celecoxib (Sigma, USA)는 10 mg/kg 용량으로 투여하기 위해 올리브 유에 10 mg/ml 농도로 현탁시킨 후, 실험동물 체중 당 1 ml/kg의 양으로 경구투여하였다.

### 4) 실험군의 분류

실험동물을 실험환경에 일주일간 적응 시킨 후 체중을 측정하여 각 군당 체중이 고르게 8마리씩을 배정하였다. 정상군 (Sham group)은 양측 슬관절강 내에 각각 주사용 생리식염수 0.1 ml을 주사하고 21일간 1일 1회 증류수를 경구투여 하였다. 대조군 (Control group)은 양측 슬관절강 내에 각각 MIA 용액 0.1 ml을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 21일간 1일 1회 증류수를 경구투여 하였다. ASA 처치군 (Treated group)은 양측 슬관절강 내에 각각 MIA 용액 0.1 ml을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 21일간 1일 1회 추출물 (20, 100, 및 500 mg/kg)을 경구투여 하였다. 양성대조군은 양측 슬관절강 내에 각각 MIA 용액 0.1 ml을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 21일간 1일 1회 celecoxib (10 mg/kg)를 경구투여 하였다.

### 5) 체중의 측정

실험 개시일, 7일, 14일, 21일 에 모든 실험군의 체중을 측정하였다.

### 6) 표본의 처리

실험 종료일에 모든 개체를 에테르로 안락사 시킨 후, 우측 고관절 부위 및 족근관절 부위를 절단하여 슬관절 부위를 적출하였다. 적출된 슬관절강내에 주사용 생리식염수 0.2 ml을 주입하여 세정하였으며, 세정 후 슬관절강을 노출시켜 자체 제작한 원심관을 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심하여 세정된 활액을 채취하였다<sup>8)</sup>. 채취된 활액은 8,000 rpm에서 10분간 원심하여 불순물을 침전시켜 제거하고 상층액을 검사전까지  $-70$  °C에서 냉동보관하였다. 활액을 분리한 후 우측 슬관절을 10% 중성포르마린액에 24시간 고정하고 경골을 분리하여 관절연골의 육안 관찰 및 Safranin O 염색에 사용하였다.

### 7) 관절연골의 육안 관찰

고정된 우측 경골 근위단의 관절연골 주변을 깨끗이 정리하고 사진 촬영하여 육안적으로 관절연골표면의 상태를 관찰하였다.

8) 관절연골의 면적 및 proteoglycan (PG) 함유율 평가

육안관찰에 사용된 경골 근위단을 40% formic acid액과 20% sodium citrate액을 동량으로 섞은 탈회액에 담가 4일간 교반 시키면서 탈회시켰다. 탈회된 경골 근위단의 정중 관상 단면을 만들고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 $\mu$ m 두께의 박절편을 제작하였다.

경골 근위단 관절연골내의 PG 변성을 확인하기 위하여 박절편된 표본을 Safranin O 염색 및 Hematoxylin 대조염색을 실시하였다. 저배율의 시야에서 관절연골이 모두 보이도록 조직사진을 촬영한 후 칼라영상분석기 (Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 내측 및 외측 관절연골의 면적과 관절연골에서의 투과도를 측정하였다. 정상군에서 측정된 관절연골의 면적 및 투과도의 평균을 100%로 설정하고, 각 실험군에서의 면적 및 투과도를 환산하여 관절연골의 PG 함유율로 평가하였다.

9) 활액 내 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 함량 측정

활액 내 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit (Thermo Scientific, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액을 제공된 plate에 첨가하여 충분히 반응시킨 후, biotinylated antibody reagent 첨가하여 결합시키고 streptavidin-HRP solution을 결합시킨 뒤 TMB substrate solution을 이용하여 발색시켰다. 이후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader (Synergy2, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 연골 내 MMP2, MMP9 및 TIMP1 유전자 발현량 측정

각 실험동물의 연골을 20 mg씩 취하여 분쇄액에 넣고 분쇄하였다. 이후 QIAshredder column (QIAGEN, USA)을 이용하여 원심분리한 후 통과해 나온 분쇄액에서 RNeasy mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 RNA는 Quantitect RT kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 RNA에 gDNA wipeout buffer를 첨가한후 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 이후 Reverse transcriptase와 RT buffer, RT primer mix를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시켜 cDNA로 합성하였다.

연골 내 MMP2, MMP9, 및 TIMP1 유전자 발현량은 QuantiSpeed Sybr Kit (PhileKorea, Korea)와 각각의 primer를 이용하여 Realtime PCR법을 이용하여 측정하였다 (Table 1). Master Mix 10  $\mu$ l에 각 gene 및 template를 첨가한 후 RNase-free water를 이용하여 최종 볼륨을 20  $\mu$ l로 만들었다. 이 시료를 Rotor-gene Q Realtime PCR (Qiagen, USA)을 이용하여 PCR을 수행하였으며 (Polymerase activation (95 $^{\circ}$ C, 2 min), 40 cycle of Denaturation (95 $^{\circ}$ C, 10 sec) and Anneal/Extension (60 $^{\circ}$ C, 30 sec)), 동사의 Rotor-gene Q series software 1.7을 이용하여 분석하였다.

Table 1. Primer sequences of MMP2, MMP9, and TIMP1

Gene	Template
MMP2	Sense 5' -TGG TCC GAG TAA AGT ATG-3'
	Antisense 5' -GTC CTT CTC AAA GTT GGTA C-3'
MMP9	Sense 5' -CTG GAA GGT ATT ATG TAA CC-3'
	Antisense 5' -GAA GGA AGA ACC AAC ATC-3'
TIMP1	Sense 5' -GGC TAA ATT CAT GGG TTC-3'
	Antisense 5' -GAG CAT CTT AGT CAT CTT G-3'

11) 통계분석

측정항목의 유의성 분석은 통계 프로그램 (GraphPad Prizm 6, USA)을 이용하여 일원분산분석 (one-way ANOVA)과 사후분석 (Dunnett's post hoc test)을 실시하여 검증하였으며, 유의성은 p<0.05 수준에서 판단하였고, 모든 측정치는 mean  $\pm$  S.E.M.으로 표시 하였다.

III. 결 과

1. 약물 투여에 의한 체중 변화

실험 개시일, 7일, 14일, 21일 에 모든 실험군의 체중을 측정하였다. 그 결과 약물 투여로 인한 실험군 간의 체중 변화량에서 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다 (Figure 1).

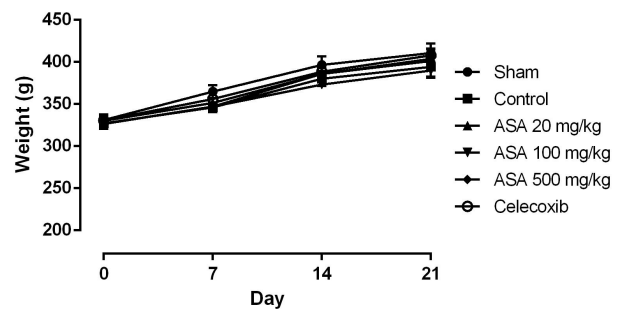


Figure 1. Effects of ASA Treatment on the body weight changes of monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritic rats. Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control).

2. 관절연골의 육안조건

각 실험군의 관절 연골 상태를 육안으로 관찰한 결과 정상군의 슬관절을 구성하는 경골 근위단의 관절연골 표면은 윤택감이 있고 매끄러운 상태로 관찰되었다. 대조군의 경골 근위단의 관절연골 표면은 모든 예에서 윤택감이 사라지고 표면이 거칠었으며, 부위에 따라서는 연골표면이 소실되어 있었다. 그리고 모든 용량의 ASA 약물 투여군과 양성대조군인 celecoxib 투여군에서는 연골의 윤택감이 사라지고 표면이 거칠게 관찰되었으나, 대조군에 비해서 그 정도는 완화되어 있었다 (Figure 2).

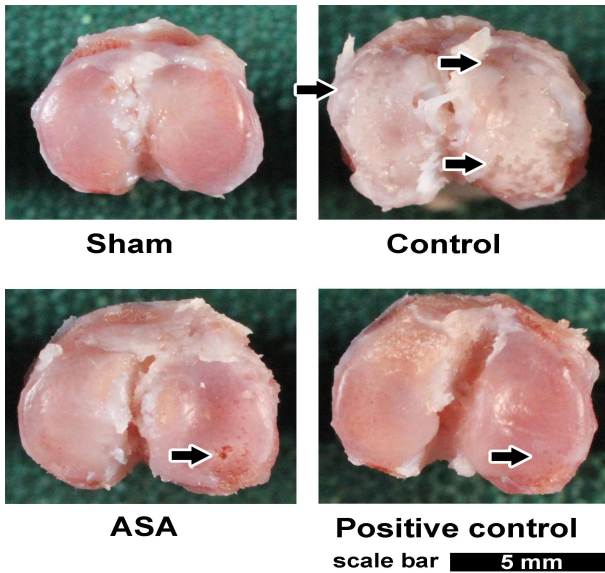


Figure 2. Photograph of tibial patelae. The articular surfaces of tibias of sham group are smooth and glossy. Focal areas of articular surfaces are discolored and some areas are deeply ulcerated (arrow). ASA : ASA treated group (500 mg/kg). Positive control : celecoxib treated group (10 mg/kg).

### 3. 관절연골의 proteoglycan (PG) 함유량 차이

Safranin O 염색하여 관찰한 정상군의 관절연골은 진한 붉은 분홍색으로 전층이 염색되어 PG 함유량이 풍부한 상태로 관찰되었다. 대조군의 관절연골층 중앙부위는 형태를 유지하고 있었으나 safranin O 염색에 매우 열게 염색되거나 또는 전혀 염색되지 않았다. 약물 투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해서 염색된 범위 및 강도가 증가되어 있었다 (Figure 3). 칼라영상분석기를 통해서 측정된 각 군에서의 safranin O 염색정도를 관절연골내 PG 함유율로 평가하였다. 그 결과 정상군은 100 ± 1.3%의 PG 함유율을 나타내었으며 대조군은 66.4 ± 3.4%로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 약물 20, 100, 및 500 mg/kg 투여군에서의 PG 함유율은 각각 73.7 ± 3.1%, 83.2 ± 3.9%, 및 89.1 ± 2.5%를 나타내어 약물 100 및 500 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의한 PG 함유율의 회복을 확인할 수 있었다 (Figure 4).

### 4. 활액 내 TNF-α 및 IL-1β 함량

활액 내 TNF-α 및 IL-1β 함량은 Thermo Scientific사의 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과 활액 내 TNF-α의 발현량은 정상군의 경우 51.5 ± 3.9 pg/ml을 나타내었으며, 대조군은 56.3 ± 2.5 pg/ml의 발현량을 나타내어 정상군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 약물 20, 100, 및 500 mg/kg 투여군에서는 각각 52.6 ± 3.1, 55.2 ± 3.4, 및 54.8 ± 3.7 pg/ml의 발현량을 나타내어 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으나 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 5).

활액 내 IL-1β의 발현량은 정상군의 경우 123.7 ± 14.8 pg/ml을 나타내었으며, 대조군은 154.8 ± 8.7 pg/ml의 발현

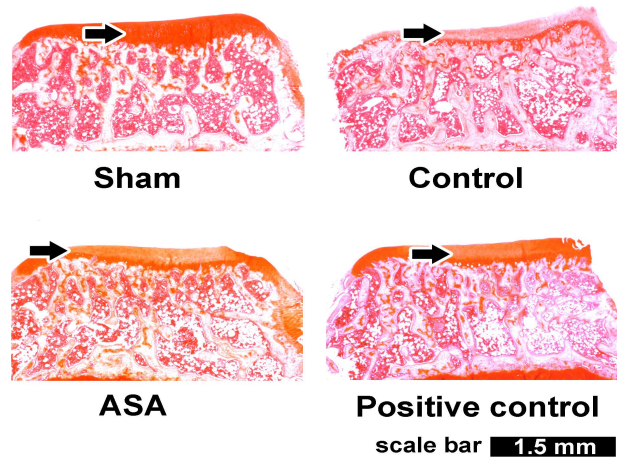


Figure 3. Safranin O stain intensity of articular cartilage of tibial patelae. Stain intensity of red color increased in proportion to proteoglycan content (arrow). ASA : ASA treated group (500 mg/kg). Positive control : celecoxib treated group (10 mg/kg).

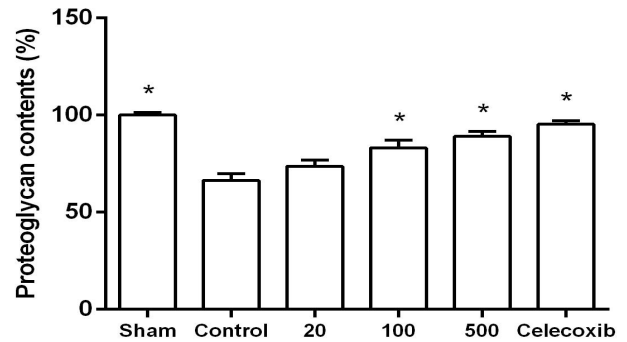


Figure 4. Effects of ASA treatment on the proteoglycan contents in articular cartilages of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control). \*: Statistical difference compared with control group (p<0.05).

량을 나타내어 관절염 유발 동물모델에서 통계적으로 유의하게 IL-1β의 발현량이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 약물 20, 100, 및 500 mg/kg 투여군에서는 각각 145.3 ± 10.0, 119.6 ± 15.4, 및 125.7 ± 8.7 pg/ml의 발현량을 나타내어 약물 100 및 500 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의한 IL-1β의 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Figure 6).

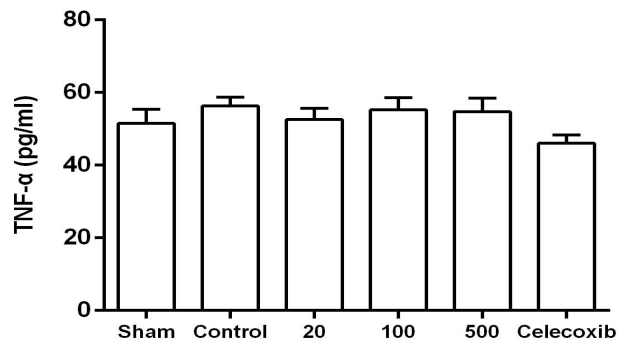


Figure 5. Effects of ASA treatment on the tumor necrosis factor-α (TNF-α) contents in synovial fluids of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control).

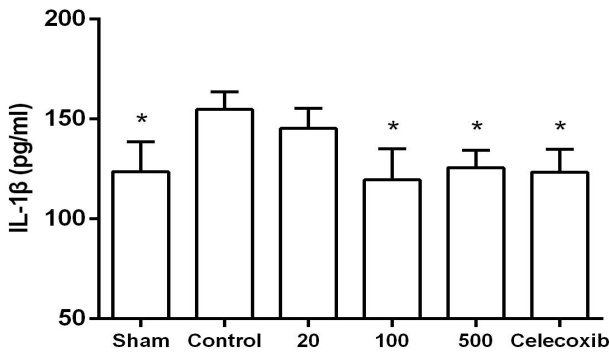


Figure 6. Effects of ASA treatment on the interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) contents in synovial fluids of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control). \*: Statistical difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

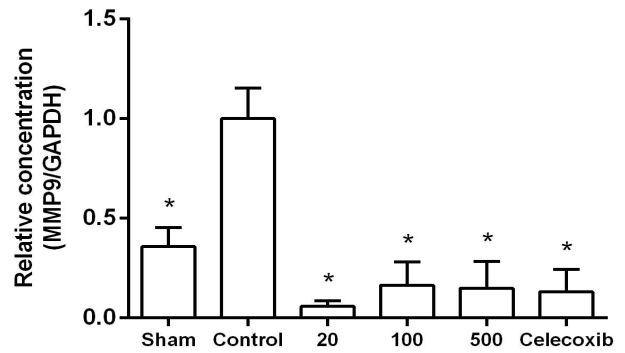


Figure 8. Effects of ASA treatment on the matrix metalloproteinase 9 (MMP9) mRNA contents in the articular cartilage of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control). \*: Statistical difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

### 8. 연골 내 MMP2, MMP9, 및 TIMP1 유전자 발현량 측정

각 실험 동물의 연골로부터 RNA를 추출한 뒤 cDNA로 합성하였다. 이후 Realtime PCR법을 이용하여 연골 내 MMP2, MMP9, 및 TIMP1 유전자 발현량을 측정하였다. 그 결과 MMP2의 발현량은 대조군 ( $1.00 \pm 0.17$ )에 비해 약물 20, 100, 및 500 mg/kg을 투여한 실험군은 각각  $0.44 \pm 0.15$ ,  $0.20 \pm 0.12$ , 및  $0.17 \pm 0.08$ 배의 MMP2의 발현량을 나타내어 농도 의존적으로 MMP2의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 감소 효과를 확인하였다 (Figure 7). 정상군의 MMP9의 발현량은 대조군 ( $1.00 \pm 0.15$ )에 비해 약물 20, 100, 및 500 mg/kg을 투여한 실험군에서 각각  $0.06 \pm 0.03$ ,  $0.16 \pm 0.12$ , 및  $0.15 \pm 0.13$ 배의 MMP9의 발현량을 나타내어 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 MMP9의 발현 감소 효과를 확인하였다 (Figure 8). 그리고 TIMP1의 발현량은 대조군 ( $1.00 \pm 0.14$ )에 비해 약물 20, 100, 및 500 mg/kg을 투여한 실험군에서 각각  $3.06 \pm 0.39$ ,  $2.18 \pm 0.68$ , 및  $2.69 \pm 0.60$ 배의 TIMP1의 발현량을 나타내어 약물 20, 100, 및 500 mg/kg 실험군에서 통계적으로 유의하게 TIMP1의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 9).

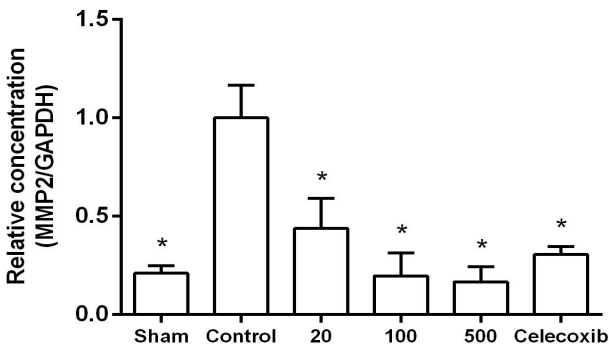


Figure 7. Effects of ASA treatment on the matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mRNA contents in the articular cartilage of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg, respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control). \*: Statistical difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

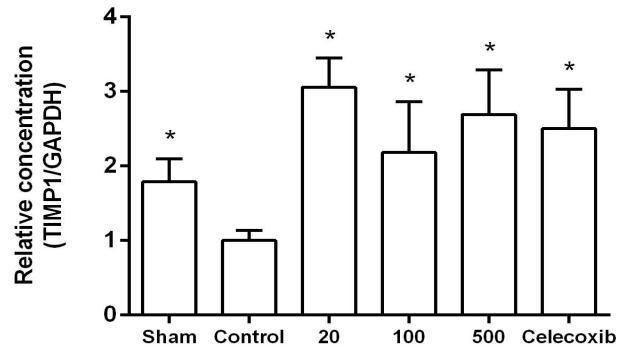


Figure 9. Effects of ASA treatment on the tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP1) mRNA contents in the articular cartilage of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats. Numbers in X-axis are ASA-treated concentrations (20, 100, and 500 mg/kg respectively). Celecoxib (10 mg/kg, used as a positive control). \*: Statistical difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

## IV. 고찰

골관절염은 주로 체중의 부하가 많은 관절에 빈번하게 침범하여 관절 연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골 연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등을 특징으로 하며 임상적으로는 반복적인 동통, 관절 강직감 및 점진적인 운동 장애를 초래한다<sup>1)</sup>.

골관절염의 발병기전은 다음의 세단계 과정으로 설명이 가능하다. 첫 번째 단계는 여러 기계적인 자극이나, 염증으로 인한 효소반응, 대사의 변화 등에 의해 연골기질의 손상 또는 변화가 일어나는 단계이며, 두 번째 단계는 연골세포가 조직 손상이나 변화를 감지하여 이화작용 및 동화작용이 모두 일어나는 단계이고, 세 번째 단계는 치유와 재형성 과정이 실패함으로써 진행되며 점진적인 관절연골의 소실 및 연골세포의 동화작용 및 증식반응이 감소가 나타나는 기전으로 진행된다. 이 때 연골의 손상과 활막 염증이 확인되는데 기존 연구결과를 살펴보면, IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  같은 사이토카인들이 활막세포 또는 단핵세포 등에서 생성되고, 그 사이토카인이 MMP 유전자 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

발현된 MMP는 관절의 병태생리학적 환경에 복잡한 관여를 하는데, 골관절 변화에는 류마티스성 관절염과 골관절염을 유

발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 MMP 기능의 억제가 관절염 예방 및 치료의 효과적인 방법이다. 관절염이 유발된 조직에 MMP의 억제 유전자인 TIMP 발현이 저하되어 있어 MMP와 TIMP 발현의 균형이 깨져있음을 알 수 있다고 보고되고 있고, 현재 TIMP와 같은 역할을 수행하는 합성 MMP저해제가 임상시험을 통해 그 유효성을 확인하고 있다. 따라서 골관절염의 진행과 치료과정에 MMP와 TIMP의 역할이 매우 중요하다<sup>10)</sup>.

본 논문에서는 한의학적 효능과 항염증 효능을 근거로 하여 도출된 ASA의 골관절염에 대한 유효성을 확인하고자 흰쥐의 슬관절강 내로 MIA를 주입하여 골관절염을 유발한 후 ASA를 경구투여하여 슬관절의 연골 상태를 관찰하고, 관절연골내 PG 함유율과 활액내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 함량 및 MMP2, MMP9, TIMP1 발현을 측정하였다.

본 연구에 사용된 MIA는 관절강 내에 주입시 관절 연골 세포에서 진행되는 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여, 관절연골의 대사과정을 저해시키고, 관절연골의 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발 실험에서 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등의 양상이 사람의 골관절염과 매우 유사하다고 보고되었다<sup>7,11)</sup>. 본 연구에서 양성대조군으로 사용한 celecoxib는 선택적 COX-II 저해제로 골관절염(퇴행관절염)의 증상이나 징후의 완화, 류마티스관절염의 증상이나 징후의 완화를 위해 현재 임상에서 사용하고 있는 약물이다<sup>12)</sup>.

실험동물의 관절 연골 상태를 육안으로 관찰한 결과 MIA로 관절염을 유발한 대조군의 경골 근위단의 관절연골 표면은 모든 예에서 관절 연골 표면의 윤택감이 사라지고 표면이 거칠었으며, 부위에 따라서는 연골표면이 소실되어 함몰된 부분이 많이 있었다. 그러나 ASA 약물 투여군에서는 연골 표면 소실 및 윤택감 상실이 완화되어 있었다.

관절 연골 내 윤활액의 역할을 수행하는 PG는 단백질과 복합된 산성 점액성 다당류로 골관절염에서는 PG 성분의 감소가 나타나 관절면 주위에 분포되어 있는 연골의 퇴행성 변화를 야기한다. PG의 파괴가 진행되면 관절연골의 탄력성, 압축력 등의 기계적인 성질이 변화되면서 관절막과 관절액의 변화가 동반되어 윤활작용, 이화작용에 의한 대사물질의 제거, 관절 표면에 대한 영양공급 등에 장애를 받게 된다<sup>13)</sup>. PG의 측정은 Safranin O 염색을 통해 양을 정량할 수 있다. 이를 통해 PG함량을 관찰한 결과 ASA 투여군에서 통계적으로 유의한 PG 함유율의 회복을 확인할 수 있었다.

골관절염이 진행될때 IL-1 $\beta$  등의 cytokine의 생성이 증가하고 collagenase, stromelysin 등과 같은 분해효소의 분비가 증가되어 관절연골의 파괴가 이루어지는데 이 cytokine의 생성 억제는 골관절염의 치료에 있어서 매우 중요한 요소이다<sup>14)</sup>. 본 연구에서는 ASA 투여군에서 통계적으로 유의한 IL-1 $\beta$ 의 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.

IL-1 $\beta$ 는 연골세포, 활액, 활막세포로부터 MMPs의 생성과 분비를 촉진시켜 연골 기질의 파괴를 증가시킨다고 알려져 있다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 연골 내 MMP2, MMP9, 및 TIMP1 유전자 발현량을 측정한 결과, ASA 투여에 의해 통계적으로 유의하게 MMP2 및 MMP9의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며, ASA 투여에 의해 통계적으로 유의하게 TIMP1의 발현을 증

가시키는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과로 미루어 보아, 본 ASA 약물은 MIA로 유발한 골관절염 모델에서 관절연골 보호효과를 보였으며, 이는 IL-1 $\beta$ 의 발현 억제를 통해 MMP2 및 MMP9의 발현증가를 억제하고 TIMP1의 발현 감소를 회복시키는 기전으로 골관절염 치료효과를 보인 것으로 생각되며, 본 연구결과는 한약 복합물의 효능에 대한 현대과학적 유효성을 밝히는 일에 근거자료로 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

## V. 결 론

牛膝 등 복합 추출물의 MIA로 유발한 골관절염 모델에서 관절연골 보호효과를 도출하는 연구를 수행하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 牛膝 등 복합 추출물은 MIA로 유발한 골관절염 모델에서 관절 연골 손상을 보호하였으며, PG함량 손실을 통계적으로 유의하게 억제하였다.
2. 牛膝 등 복합 추출물은 MIA로 유발한 골관절염 모델에서 활액 내 IL-1 $\beta$ 의 발현 증가를 통계적으로 유의하게 억제하였다.
3. 牛膝 등 복합 추출물은 MIA로 유발한 골관절염 모델에서 관절 연골 내 MMP2 및 MMP9의 발현증가를 억제하였고 TIMP1의 발현을 증가시켰다.

## 참고문헌

1. The society of Korean medicine rehabilitation, Korean rehabilitation medicine, 3rd ed, Seoul : Kunja press, 2011 : 84-98.
2. Lee YJ. Medical treatment of osteoarthritis. The Korean Journal of Medicine, 2004 ; 67(5) : 564-7.
3. Moon HP. Korea Health Statistics 2013 : Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-1), Seoul : Division of Health Policy, 2014 : 678.
4. Pak J, Lee JH, Park KS, Jeong BC, Lee SH. Regeneration of Cartilage in Human Knee Osteoarthritis with Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Autologous Extracellular Matrix, Biores Open Access, 2016 ; 5(1) : 192-200.
5. Kim MR, Hur SY, Park KH. Oriental and western medical treatment of osteoarthritis. The Journal of Jehan Oriental Medical Academy, 1999 ; 4(1) : 711-22.
6. Kim MG, Leem KH, Jeong T, Kim J. Study on the optimal mixing ratio of *Achyranthis Japonicae Radix*-containing mixture in terms of its anti-inflammatory effects on RAW264,7 cells, Semyung Oriental Medicine

- Institute, 2016 ; 18 : 31-44.
7. 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. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 ; 9(8) : 751-60.
  8. Park DS, Kim SJ, Jeong SH, Seo IB. Effects of Gyeonbi-Tang Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Mild Osteoarthritis in Rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2011 ; 25(1) : 84-91.
  9. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002 ; 39(1-2) : 237-46.
  10. Amălinei C, Căruntu ID, Giuscă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*. 2010 ; 51(2) : 215-28.
  11. Wu W, Xu X, Dai Y, Xia L. Therapeutic effect of the saponin fraction from *Clematis chinensis* Osbeck roots on osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate through protecting articular cartilage. *Phytother Res*. 2010 ; 24(4) : 538-46.
  12. Lipsky PE, Isakson PC. Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl*. 1997 ; 49 : 9-14.
  13. McDevitt CA. Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1973 ; 32(4) : 364-78.
  14. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 ; 6(3) : 177-86.
  15. Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007 ; 38(3) : 151-6.