

Inhibitory Effects of Schisandrae Fructus Ethanol Extract on the Production of Matrix Metalloproteinases in *in vitro* and *in vivo* Osteoarthritis Models

Jin-Woo Jeong^{1,2}, Hye Hyeon Lee^{1,2}, Hong Jae Kim^{1,2}, Ki Won Lee³, Ki Young Kim³, Sung Goo Kim³, Su-Hyun Hong¹, Bum Hoi Kim⁴, Cheol Park⁵ and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Open Laboratory for Muscular & Skeletal Disease Control, and Department of Biochemistry Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

²Anti-Aging Research Center and Blue Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 47340, Korea

³Research Institute, Bio-Port Korea INC, Marine Bio-industry Development Center, Busan 46048, Korea

⁴Department of Anatomy, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

⁵Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Donggeui University, Busan 47340, Korea

Received September 6, 2017 / Revised September 8, 2017 / Accepted September 11, 2017

Schisandrae Fructus (SF), the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., is widely used in traditional medicine for the treatment of a number of chronic diseases. SF extracts have been recently reported to attenuate the inflammatory responses in SW1353 human chondrocyte cells in *in vitro* and monosodium iodoacetate (MIA)-induced cartilage degradation in *in vivo* osteoarthritis (OA) models. However, their protective and therapeutic potentials against OA in primary culture chondrocytes and animal models remain unclear. Therefore, we investigated the effects of the ethanol extract of SF on the activity of matrix metalloproteinases (MMPs), biomarkers for diagnosis of OA, on interleukin (IL)-1 β -induced primary cultured rat cartilage chondrocytes and MIA-induced osteoarthritis in a rat model. Our data indicated that SF treatment significantly reduced the mRNA expression and enzyme activity of MMP-1, -3 and -13 in IL-1 β -induced primary cultured rat cartilage chondrocytes. The chondro-protective effects of SF were then analyzed in a rat OA model using a single intra-articular injection of MIA in the right knee joint. According to our results, the elevated levels of MMP-1 and -3 were markedly ameliorated by SF administration. Collectively, these findings indicate that SF could be a candidate for the treatment of OA.

Key words : Interleukin-1 β , matrix metalloproteinase, monosodium iodoacetate, osteoarthritis, Schisandrae Fructus (SF)

서 론

퇴행성관절염(osteoarthritis)은 관절에 일어난 염증으로 통증 뿐만 아니라, 관절강직(joint stiffness) 및 부종(edema)이 동반되고 면역계 이상, 감염, 외상, 대사 장애 등과 더불어 일상생활의 활동 및 운동 장애를 유발하여 삶의 질을 저하시키는 대표적인 퇴행성 질환이다[7]. 퇴행성관절염의 가장 큰 악화 요인으로는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성 증가이며, 이로 인하여 연골을 구성하는 collagen matrix의 손상을 유발한다[17, 22]. MMPs는 proteoglycan, collagen, gelatin 및 aggrecan 등 연골을 구성하는 기질단백질분해효소로서, in-

terleukin-1 (IL-1)과 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 같은 염증성 cytokine에 의해 활성이 증가된다. 다양한 MMPs 중에서 주된 역할을 하는 것이 MMP-1 (collagenase)과 MMP-3 (stromelysin)이며, 이들의 활성은 tissue inhibitors of MMPs (TIMPs)에 의하여 억제된다. MMPs와 TIMPs는 특히 교원질 및 단백당과 같은 세포외기질 성분의 분해에 관여하여 퇴행성관절염의 병인에 중요한 역할을 한다. 따라서 퇴행성관절염 환자의 경우 MMPs가 TIMPs에 비하여 훨씬 높게 발현되고 있으며, 상대적인 MMPs의 과다생성이 퇴행성관절염에서의 연골분해와 관련이 있다[6, 8, 22].

현재 퇴행성관절염의 극복을 위한 근본적인 치료 요법이 없기 때문에 acetaminophen, ibuprofen이나 indomethacin과 같은 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs), hyaluronic acid 혹은 corticosteroid 등을 이용한 통증 완화와 연골 손상 방지 등이 관절염 약물 치료제로 사용되고 있다[1, 3, 14]. 그러나 이들 약물은 근본적인 치료가 불가능할 뿐 만 아니라 장기간 사용 시 위장관 및 신장 부작용, 심혈관계 부작용, 과민반응 및 면역체계 악화 등의 문제점이 발생 할 수 있다[19]. 이처럼 퇴행성관절염 치료제의 부작용이 심각해지면서 최근 천연물

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 이용한 퇴행성관절염 예방과 치료에 관심이 증대되고 있다. 동의보감(東醫寶鑑)에 의하면 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon, Omija)는 성질이 따뜻하고 독이 없으며 신맛, 쓴맛, 매운맛, 짠맛, 단맛 등 다섯 가지의 맛을 가지고 있는 생약으로 예로부터 거담, 진해, 정친, 철혈, 검한, 생전지갈 등 여러 가지의 약효가 있다고 기록되어 있다. 오미자는 anthocyanin 뿐만 아니라 다양한 flavonoids 및 유기산류 등이 풍부하며, 간장보호[5, 10], 숙취해소[25, 27], 혈압강하[26], 항산화작용[24], 항암 및 면역증강[18] 등 다양한 생리적 활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 선행연구에 따르면 대식세포(macrophage) 모델을 이용한 실험에서 오미자 추출물이 nuclear factor- κ B 및 mitogen-activated protein kinases의 활성 억제를 통하여 nitric oxide와 prostaglandin E2 등의 염증성 인자 생성을 억제함으로써 항염증 작용을 가질 수 있음이 보고된 바 있다[13]. 또한 IL-1 β 를 이용한 연골세포(chondrocytes) 모델에서 오미자 추출물이 염증성 인자의 생성을 억제할 뿐만 아니라 MMPs 효소활성을 억제하여 퇴행성관절염에 대한 보호 효능 가능성이 알려진 바 있으며[12], monosodium iodoacetate (MIA)로 유도된 퇴행성관절염 동물모델에서도 염증성 인자 및 MMP-13의 효소활성을 저해시킨다고 보고한 바 있다[11]. 이러한 결과를 살펴볼 때 퇴행성관절염과 같은 염증성 질환으로 인한 연골 소실을 방지할 수 있는 기능성 후보소재로서 오미자 추출물의 활용 가능성이 도출되었으나, primary culture된 연골세포에서 MMPs의 조절 기전과 *in vivo* 모델에서 MMP-1 및 -3의 조절효능 여부는 아직 밝혀진바 없다. 이에 본 연구에서는 오미자 추출물이 primary culture된 *in vitro* 연골세포 모델 및 *in vivo* 모델에 미치는 연골 기질 손상에 대한 기전을 추가로 해석하고자 한다.

재료 및 방법

오미자 추출물의 제조

본 연구에 사용된 오미자는 경상북도 문경 일대에서 수거한 것으로 건조 및 냉동 보관하였다. 이를 분쇄하고, 90 $^{\circ}$ C 조건에서 20% 에탄올로 4시간 동안 추출하여 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-144, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 농축한 다음 3시간 동안 hydrodistillation을 통해 분리하였다[12]. 추출물(SF)을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 50 mg/ml로 희석하여 stock solution으로 만들었다.

지표성분의 HPLC 분석

오미자 지표성분의 분석을 위하여 schizandrin (Sigma-Aldrich Chemical Co.)과 gomisin A (Aladdin Inc., Beijing, China) 및 gomisin N (Avention Inc., Seoul, Korea)을 표준품

으로 사용하였다. 준비된 오미자 추출물(SF) 500 mg을 20 ml의 MeOH에 녹여 20분간 초음파 추출을 한 다음 0.45 μ m membrane filter로 여과하고, 잔류물에 MeOH 20 ml을 넣고 다시 20분간 추출한 다음 0.45 μ m membrane filter로 여과하였다. 여과액을 모두 합하여 MeOH을 넣어 50 ml로 정량하여, High-performance liquid chromatography (HPLC) 분석 시료액으로 사용하였다. 오미자 색소성분의 정량 분석에는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)이 사용되었다. HPLC 컬럼은 Waters사(Milford, MA, USA)의 Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 \times 150 mm, 5 μ m)을 사용하여 25 $^{\circ}$ C에서 분석하였고, 이동상은 acetonitrile : 물 : 포름산혼합액 = 70 : 30 : 0.1 조건으로 용리하였다. 이때 유속은 0.6 ml/min으로 하고, UV/Vis 검출기의 254 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1에 제시하였다.

연골세포 분리 및 세포배양

연골세포의 채취를 위해 4~6주령 무게 약 160~180 g 정도의 male Sprague-Dawley (SD) 쥐를 경추탈골 하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 관절연골을 2~3 mm 정도 크기로 채취하였다. 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline (PBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮긴 다음 0.1% EDTA-CDMF (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액에 30분씩 2회 처리하고(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂), 0.25% trypsin으로 1시간 반응(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)시켰다. 반응이 끝난 후 2 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 첨가하여 shaker에 120 rpm으로 12시간 동안 처리하였다. 이렇게 하여 얻어진 세포 부유액을 100 μ m pore size cell strainer (BD Falcon, Franklin lakes, NJ, USA)로 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리하였으며, 원심분리된 세포를 Hank's balanced salt solution (Hyclone Lab., Logan, UT, USA)으로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)와 Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL)에 1% penicillin-streptomycin과 1% L-glutamine, 그리고 0.1% gentamycin (Gibco-BRL)을 첨가하여 75 T flask에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 세포의 밀도 조절을 위하여 2~3일에 한 번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대 배양 하였으며 세포의 passage는 5 이하로 실험에 사용하였다.

오미자 추출물의 세포독성 여부 조사

분리된 연골세포를 6-well plate에 seeding (3 \times 10⁵ cells/well)하고 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액을 이용하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 오미자 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-

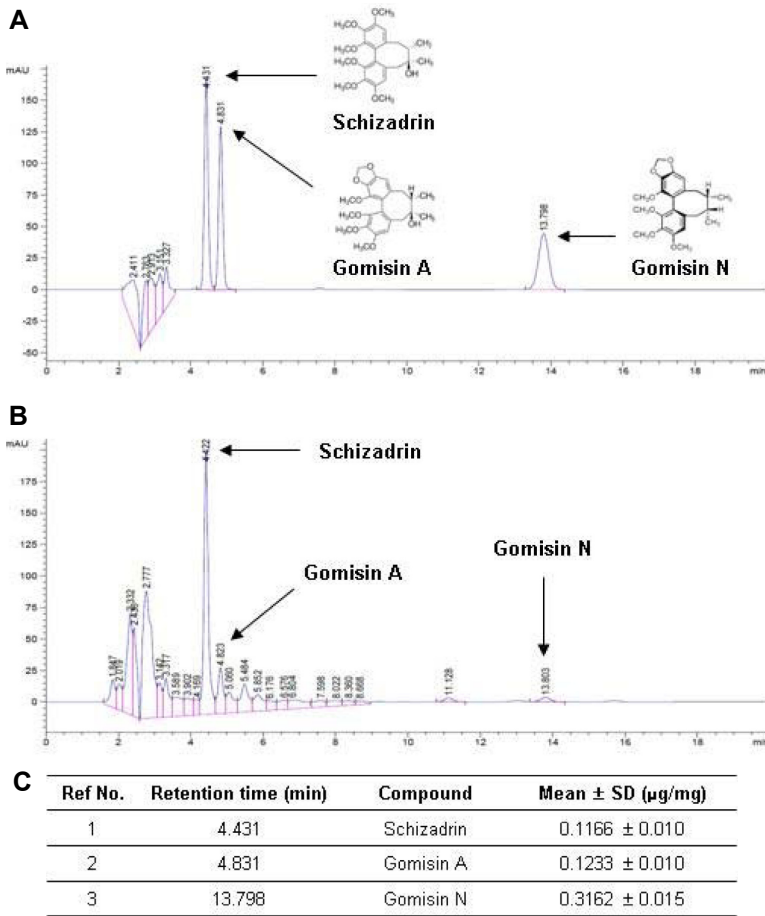


Fig. 1. Representative HPLC chromatogram of the standards (schizadrin, gomisin A and gomisin N) (A) and SF (B) were analyzed by LC-MS/MS analysis. The quantitative data of SF (C) for schizadrin, gomisin A and gomisin N were presented.

Aldrich Chemical Co.) 시약을 200 µl 처리하여 3시간 동안 37°C incubator에서 배양한 다음 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 1 ml를 가하여 560 nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (VERSAMAXSL-20, Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

분리된 연골세포에 퇴행성관절염 유도를 위하여 20 ng/ml

IL-1β (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)과 함께 오미자 추출물을 적정 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이들 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 회수하고 TRIzol 시약 (Invitrogen Corp., USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하였고, iScript Select cDNA synthesis kit (Maxime™ RT PreMix; Intron, Seongnam, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 cDNA와 각 primer (Table 1)를 이용하여 94°C에서 5분간 가열한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1.5분, 72°C에서 1분의 순서로 30회 반복하고, 이후에 72°C에서 5분간 추가 단계를 거쳤다. PCR 생성물들은 2% agaros gel을 사용하여

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name	Sequence
MMP-1	5'-CTG-TTC-AGG-GAC-AGA-ATG-TGC-3' (sense)
	5'-TTG-GAC-TCA-CAC-CAT-GTG-TT-3' (antisense)
MMP-3	5'-TGC-GTG-GCA-GTT-TGC-TCA-GCC-3' (sense)
	5'-GAA-TGT-GAG-TGG-AGT-CAC-CTC-3' (antisense)
MMP-13	5'-GGC-TCC-GAG-AAA-TGC-AGT-CTT-TCT-T-3' (sense)
	5'-ATC-AAA-TGG-GTA-GAA-GTC-GCC-ATG-C-3' (antisense)
GAPDH	5'-CGA-TGC-TGG-GCG-TGAGTA-C-3' (sense)
	5'-CGT-TCA-GCT-CAG-GGA-TGA-CC-3' (antisense)

전기영동 시키고 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 염색하였다.

MMPs 생성의 정량적 분석

MMPs의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향을 조사하기 위해서 분리된 연골세포로부터 생성되는 MMP-1, -3 및 -13의 양을 세포배양액을 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems)를 사용하여 측정하였다. 이를 위하여 1 × assay diluent 용액을 50 µl 넣은 뒤 세포 배양액 또는 각 MMP의 표준단백질을 50 µl씩 넣어 2시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 washing buffer로 5회 세척한 후 detection anti-body를 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 5회 세척하고 color reagent 용액을 100 µl 처리하여 실온에서 30분간 암 반응시킨 후 반응 정지액을 100 µl 첨가한 다음 각각의 반응 정도를 ELISA reader를 이용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

퇴행성관절염 유발

퇴행성관절염 유발을 위한 실험동물은 4~6주령 무게 약 180~200 g 정도의 male SD 쥐를 이용하였으며 Zoletile (cat. No. 06516, Virbac, Carros, France)과 Rumpun (cat. No. 41882, Bayer Korea, Seoul, Korea)을 2:1 비율로 희석한 후에 복강주사로 마취시켰다. 마취시킨 쥐의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 1 ml 주사기로 왼쪽 무릎 관절강 내에 50 µl (3 mg/kg)씩 주사하였다. MIA 희석 시에는 saline 용액을 사용하였고 약물 주사 7일 후에 관절 부위 부종 정도와 실험동물의 걷는 상태를 관찰하여 관절염 유발 확인 후 실험을 진행하였다. 본 연구는 동의대학교-동물 관리 및 윤리위원회의 절차에 따라 수행하였다(승인번호: A2015-019).

실험군 분류 및 경구투여

MIA에 의해 퇴행성관절염을 유발한 7일 후 각 개체의 체중을 측정하였고, 육안관찰을 통해 체중과 유발 정도가 고르게 8마리씩 실험군을 배정하였다. 정상군(normal group)은 생리식염수만 경구 투여하였고, 대조군(control group)은 MIA를 처리한 후 생리식염수를 처리하였으며, 약물처리군 (MIA+SF group) 및 양성대조군(MIA+CLX group)은 MIA를 처리한 후 오미자추출물 100 mg/kg 및 celecoxib 3 mg/kg을 각각 생리식염수에 녹여 3주 동안 하루 1회씩 경구 투여하였다. 체중은 3주 동안 주 4회 측정(Do, D7, D14 및 D21)하였으며, D22일째에 심장 채혈한 후 혈액으로부터 혈청을 분리하여 -70°C에 보관하였고, 슬관절 조직은 분리하여 각각 10% formalin에 담가 48시간 고정시켰다.

면역조직화학적 검사

Paraffin 포매 후 5 µm 두께로 박절한 관상 절편은 MMP-1 및 MMP-13 단백질 발현을 알아보기 위해 면역조직화학 반응 검사를 실시하였다. 각 실험 조건에 따라 처리한 관절조직의 면역조직학적 염색은 조직의 탈과라핀 과정을 끝낸 후 면역조직화학염색을 위한 전 처리 과정으로 3%의 endogenous peroxidase를 반응시키고, 0.15% triton X-100을 첨가한 PBS 용액을 사용하여 조직의 투과성을 높여 조직 내부에 1차 항체 용액이 잘 흡수되도록 하였다. Bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co.)가 포함된 용액에 1% 차단 용액으로 처리하여 비특이적 반응을 차단한 후, 0.01 M PBS로 세척하고, MMP-1 (1:50, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)과 MMP-13 (1:50, Cell Signaling Technology Inc.) 항체로 4°C에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하였다. 이후 anti-rabbit IgG (1:1,000, Abcam, Cambridge, UK)를 처리한 후 0.1% Triton X-100으로 반응시켰다. 다시 절편을 0.01 M PBS로 수세한 후 Avidin-biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)로 60분간 반응시켰으며, 0.01 M PBS로 수세과정을 거쳐 10분간 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, ZYMED Lab., Reichenbach, Germany)로 발색시켰다. 발색이 유발된 조직을 슬라이드에 올려 Hematoxylin으로 3분간 염색한 후 흐르는 물에서 수세하고 에탄올과 xylene을 이용하여 탈수 및 투명화 과정을 거친 다음 permanent mounting media를 이용하여 봉입을 실시하였다. 조직형태학적 관찰은 광학 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 그리고 각 실험군 간의 차이를 검정하기 위하여 Student's t-test를 실시하였다. 실험의 분석 시 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

결과 및 고찰

In vitro 모델에서 IL-1β에 의한 MMPs의 mRNA 발현 및 효소 활성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

Primary culture된 연골세포에 대한 오미자 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. Fig. 2A의 결과에 의하면 primary culture된 연골세포에 대한 오미자 추출물의 세포독성은 오미자 추출물을 처리하지 않고 배양한 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 500 µg/ml 농도까지는 90% 이상의 생존율이 나타났으므로 세포독성이 거의 없는 것으로 판단되지만 750 µg/ml 처리군에서는 생존율이 80% 이하로 감소되는 것으로 확인되었다. 또한 20 ng/ml 농도의 IL-1β를 500 µg/ml 이하의 오미자 추출물과 동시에 처리하였

을 경우에도 세포독성이 거의 관찰되지 않았기 때문에(Fig. 2B), 이후의 실험에서는 오미자 추출물의 처리 농도를 500 µg/ml 이하로 한정하였다.

MMPs는 정상 성장 또는 골 손상 후 회복 과정에서도 중요한 역할을 하는 효소군이지만, 관절염 유발과정에서는 연골의 세포 외 기질 성분을 분해하는 대표적인 금속 단백질효소로서 기질에 따라 collagenase, gelatinase 및 stromelysin의 세 종류로 구분된다[4]. 이들 중 연골세포 기질분해에 관여하는 중요한 효소로는 MMP-1 (collagenase-1)으로서 주로 교원질(collagen)의 분해에 관여한다. 그리고 MMP-3 (stromelysin-1)은 단백다당(glycoprotein)을 분해시키고 잠재성 MMP-1을 활성화시킴으로써 교원질과 단백다당을 분해시켜 관절연골 기질의 원섬유화(fibrillation), 침식(erosion) 및 균열(cleft)을 초래한다. 특히 사람의 악성 유방암에서 밝혀진 MMP-13 (collagenase-3)은 연골의 주성분인 Type II collagen에 대한 강한 분해작용이 있어 골관절염 발생에 있어 중요한 치료 표적이 되고 있다[2, 21, 23]. 이에 본 연구에서는 오미자 추출물에 의한 MMPs 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 primary culture된 연골세포에 IL-1β (20 ng/ml) 및 오미자 추출물을 처리함으로써 나타나는 MMP-1, -3 및 -13의 발현 변화를 RT-PCR과 효소면역정량법(ELISA)을 사용하여 확인하였다. Fig. 3에

나타낸 결과에서 알 수 있듯이, IL-1β가 단독 처리된 연골세포에서는 MMP-1, -3 및 -13의 발현 및 효소 활성이 매우 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나 오미자 추출물(100~500 µg/ml)을 처리한 결과 3가지 MMPs의 mRNA 발현이 모두 처리 농도에 의존적으로 감소되었으며, 이와 일치되게 IL-1β에 의해 증가된 MMP-1, -3 및 -13의 효소 활성이 오미자 추출물에 의해서 유의적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 3A, Fig. 3B). 이는 오미자 추출물이 연골의 세포 외 기질 성분을 분해하는 MMPs의 발현을 전사 수준에서 차단함으로써 연골세포 보호 효과를 가진다는 것을 의미한다.

In vivo 모델에서의 MIA에 의한 퇴행성관절염 유발에 미치는 오미자 추출물의 개선 효능 검증

오미자 추출물에 대한 퇴행성관절염 개선 효능을 MIA 유도 퇴행성관절염 유발 동물모델에서 확인하기 위하여 MIA 유도 모델을 사용하였다. MIA는 관절강 내에 주입 시 관절염

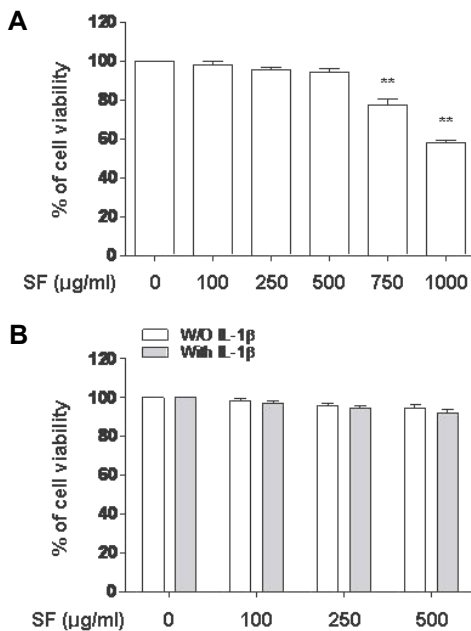


Fig. 2. Effects of SF and IL-1β on primary cultured rat cartilage chondrocyte cell viability. Cells were incubated with the indicated concentrations of SF for 24 hr (A) or with the indicated concentrations of SF or IL-1β (20 ng/ml) alone, or pretreated with 100, 250, and 500 µg/ml of SF for 1 hr before incubation with IL-1β for 24 hr (B). Cell viability was determined by the MTT assay. Data are expressed as the mean ±SD of three independent experiments (**p<0.05 vs. control group).

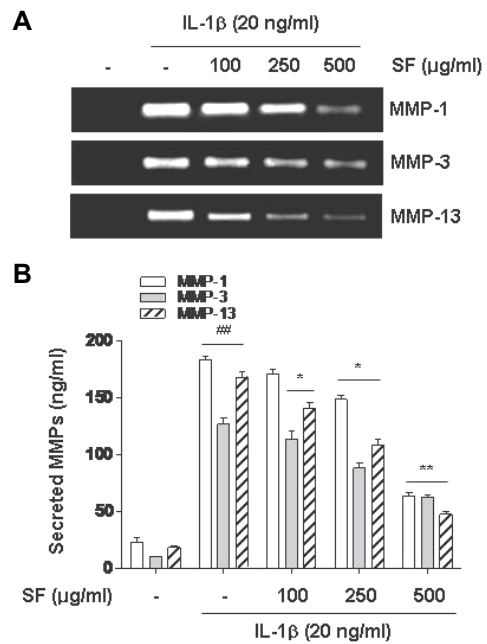


Fig. 3. Effect of SF on the mRNA expression and secretion of MMP-1, -3, and -13 in IL-1β-stimulated primary cultured rat cartilage chondrocytes. Cells were pretreated with SF (100, 250, and 500 µg/ml) 1 hr prior to incubation with IL-1β (20 ng/ml) for 24 hr. (A) Total RNA was prepared for the RT-PCR analysis of MMP-1, -3, and -13 gene expression in IL-1β-stimulated chondrocytes. GAPDH were used as internal controls for the RT-PCR assay. (B) Culture supernatants were then isolated, and the amounts of MMP-1, -3 and -13 secretion were determined using commercial ELISA kits. Each value indicates the mean ± SD and is representative of results obtained from four independent experiments (###p<0.01 vs. control group; *p<0.05 and **p<0.01 vs. IL-1β group).

Table 2. Effects of SF treatment on the body weights of MIA-induced osteoarthritis rats (N=8)

Group	Body weights (g)/days			
	D0	D7	D14	D21
Normal	175.2±8.4	202.8±9.2	252.2±10.3	302.1±11.2
MIA	172.1±12.8	182.5±10	198.4±10	224.3±12.3
MIA+SF	176.5±6.6	191.2±8.8	239.7±10.6	288.5±15.1
MIA+CLX	175.7±7.4	198.5±9.5	247.5±12.3	297.3±12.8

Note: Normal group; injected and treated with saline, MIA group; MIA (3 mg/kg) injected and treated with saline, MIA+SF group; MIA injected and treated with SF (100 mg/kg), MIA+CLX group; CLX (3 mg/kg) injected after MIA injected.

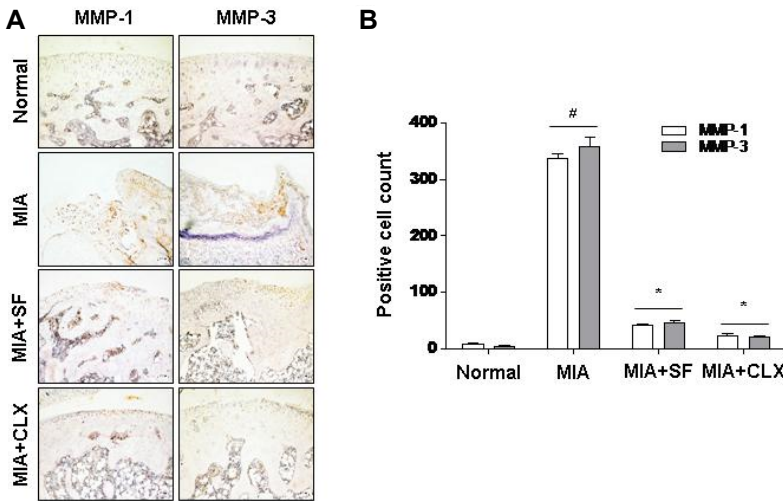


Fig. 4. Effects of SF on the expression of MMP-1 and -3 in MIA-induced OA rats. (A) The immunohistochemical staining was used to identify the expression of MMP-1 and -3 in the articular cartilage. (B) Stained cells were counted and data are expressed as mean ± SD (n=8) (#p<0.05 MIA group vs. normal control group; *p<0.05 MIA+SF and MIA+CLX groups vs. MIA group).

골세포에서 진행되는 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 활성을 억제하여, 관절연골의 대사 과정을 저해시키고, 관절연골의 변성을 일으켜 퇴행성관절염을 유도하는 물질로 잘 알려져 있다[9]. 특히 동물실험 결과들에서 MIA에 의한 퇴행성관절염의 병리학적 소견인 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등의 양상이 사람의 퇴행성관절염에서 나타나는 현상과 매우 유사하다고 보고되어져 인체 적용의 전 단계로 모델로서 널리 활용되고 있다[9, 16]. 본 실험에 사용된 MIA 주입 용량은 예비실험을 통해 퇴행성관절염의 정도를 확인한 후 최종적으로 MIA 50 µl (3 mg/kg)로 설정하였다.

MIA 유도 관절염 동물모델에서 오미자 추출물의 효능을 검증하기 전 단계로써 MIA 관절염 유도 후 각 개체의 체중을 시료의 경우투여가 시작된 날부터 3주간 측정하였다(N=8). 퇴행성관절염이 유도된 대조군은 정상군에 비하여 시험기간 동안 체중이 유의적으로 낮았으나, 오미자 추출물(100 mg/kg) 투여군의 경우 실험기간 동안 체중 증가 양상은 대조군에 비해 높고 정상군 및 양성대조군과 유사한 증가 패턴을 보였지만 통계적으로 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 그러나 MIA가 처리된 대조군 조직에서는 정상군에 비하여 MMP-1 및 MMP-3의 발현이 매우 증가됨을 확인할 수가 있었으며, 육안적 관찰에서도 관절염이 유도되었음을 확인하였다(data not shown). 그러나 오미자 추출물(100 mg/kg)을 투여한 군에서

는 대조군에 비해 증가되었던 MMP-1 및 MMP-3의 발현이 정상군 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 아울러 동일 조건에서 MMP-13의 발현 억제 양상도 이와 매우 유사하였으므로[11], 오미자 추출물이 퇴행성관절염 모델에서 관절염 유도 초기단계에 진행되는 MMP-1과 MMP-3의 효소 활성을 억제하여 연골세포 보호 예방효과가 있는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 IL-1β 및 MIA에 의하여 유발되는 퇴행성관절염 *in vitro* 및 *in vivo* 모델을 이용하여 오미자 추출물의 효능을 조사하였으며, 오미자 추출물에 의한 MMPs의 효소활성 감소에서 유의성 있는 결과를 보임에 따라 퇴행성관절염 초기 및 관절연골 개선에 그 효과가 유의적으로 작용할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업(No. 314043-3)의 지원으로 이루어졌음.

References

1. Bdouet, L., Pascale, F., Bonneau, M., Wassef, M. and Laurent,

- A. 2011. *In vitro* evaluation of (S)-ibuprofen toxicity on joint cells and explants of cartilage and synovial membrane. *Toxicol. In Vitro* **25**, 1944-1952.
2. Billingham, R. C., Wu, W., Ionescu, M., Reiner, A., Dahlberg, L., Chen, J., van Wart, H. and Poole, A. R. 2000. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum.* **43**, 664-672.
 3. Boer, T. N., Huisman, A. M., Polak, A. A., Neihoff, A. G., Rinsum, A. C., Saris, D., Bijlsma, J. W. J., Lafeber, F. J. P. G. and Mastbergen, S. C. 2009. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: *Ex vivo* evaluation of human cartilage tissue after *in vivo* treatment. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 482-488.
 4. Burrage, P. S., Mix, K. S. and Brinckerhoff, C. E. 2006. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. *Front. Biosci.* **11**, 529-543.
 5. Cheng, N., Ren, N., Gao, H., Lei, X., Zheng, J. and Cao, W. 2013. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 234-240.
 6. Dean, D. D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Howell, D. S. and Woessner, J. F. Jr. 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* **84**, 678-685.
 7. Garner, B. C., Stoker, A. M., Kuroki, K., Evans, R., Cook, C. R. and Cook, J. L. 2011. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J. Knee Surg.* **24**, 251-264.
 8. Giannelli, G., Erriquez, R., Iannone, F., Marinosci, F., Lapadula, G. and Antonaci, S. 2004. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **22**, 335-338
 9. Guzman, R. E., Evans, M. G., Bove, S., Morenko, B. and Kilgore, K. 2003. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial Joints: An animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol.* **31**, 619-624.
 10. Hikino, H., Kiso, Y., Taguchi, H. and Ikeya, Y. 1984. Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Med.* **50**, 213-217.
 11. Jeong, J. W., Kim, J., Choi, E. O., Kwon, D. H., Kong, G. M., Choi, I. W., Kim, B. H., Kim, G. Y., Lee, K. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Choi, Y. W., Hong, S. H., Park, C. and Choi, Y. H. 2017. Schisandrae Fructus ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *EXCLI J.* **16**, 265-277.
 12. Jeong, J. W., Lee, H. H., Choi, E. O., Lee, K. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Hong, S. H., Kim, G. Y., Park, C., Kim, H. K., Choi, Y. W. and Choi, Y. H. 2015. Schisandrae Fructus inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Drug Dev. Res.* **76**, 474-483.
 13. Kang, Y. S., Han, M. H., Hong, S. H., Park, C., Hwang, H. J., Kim, B. W., Kyoung, K. H., Choi, Y. W., Kim, C. M. and Choi, Y. H. 2014. Anti-inflammatory Effects of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill Fruit through the inactivation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *J. Cancer Prev.* **19**, 279-287.
 14. Laine, L., White, W. B., Rostom, A. and Hochberg, M. 2008. COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **38**, 165-187.
 15. Lee, J. H., Fitzgerald, J. B., Dimicco, M. A. and Grodzinsky, A. J. 2005. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum.* **52**, 2386-2395.
 16. Marker, C. L. and Pomonis, J. D. 2012. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol. Biol.* **851**, 239-248.
 17. Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., Cloutier, J. M. and Pelletier, J. P. 1994. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* **70**, 807-815.
 18. Park, J. H., Kim, J. H., Kim, D. H., Mun, H. C., Lee, H. J., Seo, S. M., Paik, K. H., Ryu, L. H., Park, J. I. and Lee, H. Y. 2004. Comparison of immuno-stimulatory activities by purification process of *Schizandra chinensis* Baillon fruits. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **12**, 141-148.
 19. Park, S. W., Jung, Y. S. and Ko, K. C. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **38**, 722-724.
 20. Patwari, P., Cook, M. N., DiMicco, M. A., Blake, S. M., James, I. E., Kumar, S., Cole, A. A., Lark, M. W. and Grodzinsky, A. J. 2003. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum.* **48**, 1292-1301.
 21. Piecha, D., Weik, J., Kheil, H., Becher, G., Timmermann, A., Jaworski, A., Burger, M. and Hofmann, M. W. 2010. Novel selective MMP-13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants. *Inflamm. Res.* **59**, 379-389.
 22. Salinardi, B. J., Roush, J. K., Schermerhorn, T. and Mitchell, K. E. 2006. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and synovial fluid of osteoarthritic dogs. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **19**, 49-55.
 23. Shingleton, W. D., Ellis, A. J., Rowan, A. D. and Cawston, T. E. 2000. Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: Matrix metalloproteinase-1 and 13 are involved in cartilage breakdown. *J. Cell. Biochem.* **79**, 519-531.
 24. Thandavarayan, R. A., Giridharan, V. V., Arumugam, S., Suzuki, K., Ko, K. M., Krishnamurthy, P., Watanabe, K. and Konishi, T. 2015. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling. *PLoS One* **10**, e0119214.
 25. Xing, J., Guo, Y., Hu, H., Qu, X. L., Sun, X. Z., Liu, S. H.

and Wang, H. 2012. A herbal composition of Semen Hoveniae, Radix Puerariae and Fructus Schisandrae shows potent protective effects on acute alcoholic intoxication in rodent models. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, 638197.

26. Yeo, S. G., Ahn, C. W., Lee, Y. W., Lee, T. G., Park, Y. H. and Kim, S. B. 1995. Antioxidative effect of tea extracts from

green tea, Oolong tea and Black tea. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 299-304.

27. Zhu, M., Lin, K. F., Yeung, R. Y. and Li, R. C. 2000. Evaluation of the protective effects of *Schizandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl4 intoxication model. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 928-935.

초록 : *In vitro* 및 *in vivo* 퇴행성관절염 모델에서 오미자 에탄올 추출물에 의한 matrix metalloproteinases의 생성 억제

정진우^{1,2} · 이혜현^{1,2} · 김홍재^{1,2} · 이기원³ · 김기영³ · 김성구³ · 홍수현¹ · 김범희⁴ · 박철⁵ · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 근·골격계 질환제어 융합연구실 및 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소, ³㈜바이오포터코리아, ⁴동의대학교 한의과대학 해부학교실, ⁵동의대학교 자연과학대학 분자생물학과)

노화에 따른 퇴행성관절염은 삶의 질을 저하시키는 가장 큰 병리학적 현상 중의 하나이다. 오미자 열매 (*Schisandrae Fructus*)는 오랫동안 전통의학에서 여러 가지 만성질환 치료를 위해 널리 사용되어 왔다. 오미자 추출물이 SW1353 인간 연골세포에서 IL-1 β 에 의해 유발된 염증 반응을 감소시키는 것으로 최근 보고된 바 있으나, primary culture된 연골세포 및 동물 모델에서의 퇴행성관절염에 대한 보호 및 치료 잠재력은 여전히 명확하지 않다. 따라서 본 연구에서는 IL-1 β 에 의해 유도된 primary culture된 쥐의 연골세포와 MIA에 의해 유도된 골관절염에 대한 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성화에 미치는 오미자 에탄올 추출물의 영향을 조사하였다. 오미자 추출물 처리는 IL-1 β 로 유도된 연골세포에서 MMP-1, -3 및 -13의 mRNA 발현 및 효소 활성을 유의하게 감소시켰다. 또한 오미자 추출물은 MIA에 의해 증가된 MMP-1 및 -3의 발현을 유의적으로 억제시켰다. 따라서 오미자 추출물은 퇴행성관절염 예방과 치료를 위한 기능성 소재로서의 잠재적 가능성이 있음을 알 수 있었다.