

골담초 열수추출물의 이화학적 특성 및 MIA를 이용한 동물모델에서 골관절염 개선 효과

†한 은 숙

배화여자대학교 식품영양과 조교수

The Physicochemical Characteristics and Protective Effect of Hot Water Extracts of *Caragana sinica* on MIA-induced Osteoarthritis in Rats

†Eun-Sook Han

Assistant Professor, Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea

Abstract

The purpose of this study was to examine the physicochemical characteristics of hot water extract of *Caragana sinica* roots and verified its protective effect on MIA-induced osteoarthritis in rats. The contents of total polyphenol and total flavonoid used in this experiment were 0.40 mg/g and 0.22 mg/g respectively. We found that the weight of all experiment groups which ingested *Caragana sinica* extract for three weeks evenly increased in rats with MIA-induced osteoarthritis without toxicity in the liver or kidney. In the histopathological test through the Mankin score, the extent of damage of knee joint tissue in the experiment groups to which *Caragana sinica* extract was administered in 5 mL/kg or 10 mL/kg was significantly lower than that of the negative control groups statistically ($p < 0.05$). As for the grade of osteoarthritis, the extent of tissue damage of the experiment groups to which *Caragana sinica* extract was administered in 5 mL/kg or 10 mL/kg was lower than that of the negative control groups as well.

Key words: *Caragana sinica* extract, physicochemical characteristics, osteoarthritis histopathological test

서 론

골담초(*Caragana sinica*)는 콩과(Fabaceae)에 속하는 다년생의 낙엽활엽 관목으로 전북, 경남, 충남, 경기 등 우리나라 각지에 자생하며, 봄·가을에 채취하여 햇볕에 말려 사용하거나, 술과 식혜로 만들어 마시기도 하였다(Jeon 등 2012). 골담초는 부위별로 다양한 효능이 알려져 있어 꽃은 부인병 치료, 혈액 순환, 비장의 보호에 이용하였고, 뿌리는 신경통약, 뿌리껍질은 고혈압, 관절질환 치료에 이용되었다(Lee 등 2016). 특히, 뼈를 붙이는 풀이라는 뜻의 골담초(骨痰草)는 예로부터 뼈와 관련된 질병에 사용되어 유래한 것으로 신경통, 골약, 관절염, 골절 등의 치료제로 이용되어 왔다(Jeon 등 2012).

골담초에 함유된 생리활성 물질에 대한 연구들에는 뿌리

에서 β -시토스테롤, 캄페스테롤, 브라시카스테롤과 같은 스테로이드계열 화합물과 2종의 사포닌을 분리, 동정했고(Lee 등 1990), 골담초엽에서는 acacetin-7-O-p-I-glucopyranoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside 및 apigenin-7-OP-D-glucopyranoside와 같은 플라보노이드를 분리 동정하였다(Ma 등 1999). 그 외에도 골담초에는 베틀린산과 파이스온 등의 성분이 함유되어 항염효과(Hwang & Kim 1983)가 있으며, 항고혈압, 항지혈증, 항산화 효과, 혈청 콜레스테롤 저하 및 혈관확장 작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다(Gwak & Kim 1974; Hwang & Kim 1983; Jeong 등 2007). 골담초 추출물의 생리활성에 관한 연구에는 골담초 효모 발효 추출물의 피부 미백 효능, 골담초 추출물의 생리활성 탐색, 골담초 메탄올 추출물의 진통 효과(Seok 등 2010; Jeon 등 2012; Park 등 2016) 등이 있으며, Lee 등(2016)

† Corresponding author: Eun-Sook Han, Assistant Professor, Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea. Tel: +82-2-397-0557, Fax: +82-2-737-6711, E-mail: hjohee@baewha.ac.kr

은 난소절제 동물모델을 이용하여 골담초 열수 추출액이 폐경여성의 지질 및 당질 대사에 긍정적인 영향을 미쳐 건강 기능성 소재로서의 가능성이 높은 것으로 보고하였다.

골관절염(osteoarthritis)은 관절을 보호하는 연골이 손상되거나 관절을 이루는 인대, 뼈 등이 손상을 입어 통증 및 염증이 생기는 근골격계 질환으로(Kumar 등 2015), 퇴행성 변화, 감염, 면역계 이상, 외상, 대사 장애 등 다양한 요인들이 관여한다(Garner 등 2011; Lee HS 2014). 골관절염은 관절에서 발생하는 염증성 질환 중에서 가장 발병 빈도가 높고 연령이 증가함에 따라 유병률이 증가하는 질환으로써, 특히 65세 이상의 고령인구에서 흔히 발병한다(Witter & Dionne 2004). 골관절염의 증상은 주로 체중부하가 많은 슬관절에서 발생하고(DiPiro 등 2005), 연골이 소실되는 증상은 만성적 체중부하, 비염증성 연골퇴화 및 연골 마모를 원인으로 연골세포에 의한 연골의 파괴와 재생의 균형에 문제가 발생하여 연골 세포수가 감소되는 과정을 거쳐 나타난다(Belia 등 1998). 골관절염의 치료에는 비스테로이드성 항염제, 소염진통제, 관절강 주사제 등이 이용되고 있으나, 그 치료효과가 단순 증상 완화에 그치거나 장기간의 복용 시 부작용이 보고되고 있다(Kim 등 2019). 이로 인해 골관절염의 예방과 치료에 대한 연구들에서는 약물이나 수술요법 이외의 보완대체요법을 통하여 통증과 증상 완화를 위한 해결책을 찾으려 노력하고 있으며, 그 중에서도 골관절염 동물모델을 이용하여 식품에서 유래한 물질의 효과를 검증한 연구들이 이루어지고 있다.

MIA(monosodium iodoacetate)는 동물모델에서 골관절염의 유도에 사용되는 대표적인 물질로써, 관절강 내에 투여되어 연골을 형성하는 세포인 연골세포(chondrocyte)의 해당작용을 억제함으로써 연골세포를 고사시키고 연골을 파괴한다(van der Kraan 등 1989). 이러한 MIA를 이용한 퇴행성 관절염 동물모델에서 나타나는 관절 조직의 변화는 사람의 관절염에서 나타나는 조직학적 변화와 매우 유사한 것으로 알려져 있다(Kalbhenn DA 1987). MIA로 유도한 골관절염 동물모델을 이용하여 식품 추출물의 골관절염 완화 효과를 확인한 연구에는 우슬(쇠무릎) 등 복합 추출물의 MIA로 유발한 흰쥐 골관절염에 대한 효과, 꽃송이버섯 추출물의 MIA로 유도된 골관절염 억제 효과, MIA로 유도된 골관절염 동물모델에서 상기생 물추출물의 효과, MIA로 유발된 골관절염 동물모델에서 산약 추출물의 골관절염 개선 효과(Kim 등 2017; Kim 등 2018a; Kim 등 2018b; Kim 등 2019)등이 보고되어 있다.

골담초의 약리학적 효능과 생리활성에 관한 연구는 다양하게 진행되어 왔으나, MIA를 이용하여 골관절염을 유발한 동물모델에 대한 효능평가는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 골담초의 활용도를 높이고, 골담초 추출물의 기능성을 부여하기 위한 기초 연구로 골담초 추출물을 제조한 후,

이화학적 특성을 확인하고, 대표적인 퇴행성 관절염 동물모델을 이용하여 혈청생화학 및 조직병리학적 검사를 통해 골관절염 개선 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

골담초(*Caragana sinica*) 뿌리는 2018년 경북 의성에서 수확하여 건조시킨 것으로 서울 경동시장에서 구입한 후, 냉동고(SR592AC, Samsung, Gwangju, Korea)에 -18°C 이하로 보관하면서 시료로 사용하였고, 생수(Jeju Samdasoo, Jeju province development Co., Jeju, Korea)는 서울 양재동 하나로 마트에서 구입하여 사용하였다.

2. 골담초 추출물의 제조

골담초 추출물은 Kim & Park(2012)의 방법을 변형하여 제조하였다. 본 연구에서는 골담초 뿌리를 흐르는 물에 세척한 후, 골담초 뿌리 600 g과 생수 20 L를 전통 옹기에 넣고 80°C 에서 6시간 가열하여 열수 추출하였으며, 추출물은 여과지(Whatman No 41)에 걸러 실험 전 기간 동안 사용하였다. 골담초 추출물은 -70°C 냉동 상태로 보관하면서 동물식으로 사용하였다.

3. 골담초와 골담초 추출물의 이화학적 특성 분석

1) 일반성분 및 pH 측정

골담초와 골담초 추출물의 수분(105°C 상압가열건조법), 조단백(Kjeldahl 방법), 조지방(Soxxhlet 추출법), 조회분(600°C 건식회화법)과 같은 일반성분은 AOAC 방법(2000)으로 측정하였다. 골담초 추출물의 pH는 pH meter(410-A, Orion Co., Boston, MA, USA)를 사용하여 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.

2) 당도

골담초 추출물의 당도는 당도계(Refractometer, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.

3) 색도

골담초 추출물의 색상은 Colorimeter(Parr 6400 Calorimeter, Parr Co., Moline, IL, U.S.A)를 사용하여 명도(Lightness, L), 적색도(Redness, a:적색도+ ↔ -녹색도), 황색도 (Yellowness, b: 황색도+ ↔ -청색도)를 3회 반복 측정하였다. 이때 사용한 표준색판(Standard plate)의 L 값은 97.70, a값은 0.26, b값은 2.08이었다.

4) Total polyphenol 함량

골담초와 골담초 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin & Denis 1912)에 따라 측정하였다. 각 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고, 다시 증류수로 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석된 Folin 시약(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) 0.5 mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 혼합액을 3분간 방치한 다음 10% 탄산나트륨(Duksan Co., Ansan, Korea) 2 mL를 넣고 1시간 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고, 표준물질로는 탄닌산(Yakuri Pure Chemicals Co., Osaka, Japan)를 이용하여 함량을 표시하였다.

5) Total flavonoid 함량

골담초와 골담초 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL에 10% 질산알루미늄(Duksan Co., Ansan, Korea)과 1M 아세테이트 칼륨(Duksan Co., Ansan, Korea) 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL를 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 퀘세틴(Waco Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 함량을 표시하였다.

4. MIA를 이용한 동물모델에서 골관절염 효능 평가

1) 실험동물

실험동물은 8주령의 수컷 Sprague Dauley(SD)계 쥐를 샘타코바이오코리아(경기도 오산)로부터 구입하여 사용하였다. 입수된 동물은 온도 20±3°C, 상대습도 50±20%를 유지하고, 환기횟수 10~15회/hour 및 명암 주기 12시간으로 조절되는 (주)센트럴바이오 설치류 사육 구역에서 사육되었으며, 실험식은 주 2회의 간격으로 교환했고, 실험동물은 체중 대비 10~15%의 사료를 섭취했으며(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C), 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험의 모든 절차는 (주)센트럴바이오 동물실험 윤리위원회로부터 승인을 받아 진행되었다(승인번호: CBIACUC 19082ET1).

2) MIA를 이용한 골관절염 유발 및 시험물질 투여

본 연구에서는 7일간의 안정화기간 동안 건강상 문제가 없는 쥐를 선별하여 총 5개의 시험군(군당 6마리)으로 체중을 기준으로 무작위 분리하였다. 시험군은 골관절염을 유발한 음성 대조군(MIA), 동량의 생리식염수를 주입하는 Sham 수술을 받은 정상대조군(Normal control), 골관절염을 유발하고 골담초 추출물(GDC)을 각각 5 mL/kg(GDC 5.0 mL/kg)과

10 mL/kg(GDC 10 mL/kg)을 투여한 실험군, 그리고 양성 대조약물로서 이부프로펜(Sigma-Aldrich, MA, USA)을 20 mg/kg 투여한 양성대조군(ibuprofen 20 mg/kg)으로 구성하였다.

퇴행성 관절염은 실험동물의 관절강 내에 생리식염수에 녹인 MIA(40 mg/mL)를 주입하여 유발하였으며, 골담초 추출물과 양성 대조물질은 3주간 1일 1회씩 강제 경구 투여하였다. 3주간의 투여기간 종료 후 부검하여 혈액 및 관절 조직을 채취하였다.

3) 혈청생화학적 검사

투여기간 종료 후 실험물질의 간 독성과 신장 독성 여부를 평가하기 위한 혈청생화학적 검사를 위해 CO₂ 마취 후, 개복한 실험동물의 복대동맥에서 혈액을 채취한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 얻어진 혈청은 자동생화학분석기(Hitachi 7020, Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 간 독성지표 아스파테이트 아미노전이효소(AST), 알라닌 아미노전이효소(ALT)와 신장 독성지표 혈액요소질소(BUN), 크레아티닌을 분석하였다.

4) 조직병리학적 검사

MIA를 이용하여 퇴행성 관절염을 유발한 SD 쥐의 조직병리학적 검사를 하기 위하여 방혈치사 후 실험동물의 무릎 관절을 적출하였으며, 10% 중성 완충 포르말린(BBC Biochemical, Inc., WA, USA)에 2일간 고정하였다. 이후 5% 포름산(RapidCal™, BBC Biochemical, Inc., WA, USA)에서 48시간 동안 관절 조직의 탈석회화 과정을 거친 후 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정하여 블록을 제작하였다. 고정된 파라핀 블록은 5µm 두께로 박절한 후 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색과 Safranin O 염색을 실시하여 광학현미경(Olympus BX51, Olympus Co., Ltd, USA)으로 관찰하면서 관절염 분류 기준에 따라 손상 정도를 점수화하였다. 조직 판독은 일부 변경된 Mankin Score를 기준으로 실시하였다(Table 1). H&E 염색 슬라이드를 관찰하여 연골의 구조 변화를 6점 척도로 구분하였으며, 연골 세포의 사멸 정도를 3점 척도로 사용하였다. 또한 tidemark의 손상 유무에 따라 1점을 추가 부여하고, 연골조직 염색법인 Safranin O 염색 슬라이드를 관찰하여 염색강도에 따라 4점 척도로 구분하였다(Ha & Chang 1999; Pearson 등 2011). Mankin score는 총점을 기준으로 0-2점은 정상 연골, 3-5점은 외부 섬유형성, 6-7점은 경미한 연골 손상, 8-10점은 심한 연골 파괴 그리고 10을 초과하는 경우는 완전한 연골 파괴로 판정하였다(Pearson 등 2011).

5. 통계처리

실험결과의 통계처리는 SPSS software(IBM SPSS Version

Table 1. Mankin score

Group	Symptom	Grade
Structure	Normal	0
	Surface irregularities	1
	Pannus and surface irregularities	2
	Clefts to transitional zone	3
	Clefts to radial zone	4
	Clefts to calcified zone	5
	Complete disorganisation	6
Cells	Normal	0
	Diffuse hypercellularity	1
	Cloning	2
	Hypocellularity	3
Safranin-O staining	Normal	0
	Slight reduction	1
	Moderate reduction	2
	Severe reduction	3
	No dye noted	4
Tidemark integrity	Intact	0
	Crossed by blood vessels	1

23.0., IBM Corp., Armonk NY, USA)를 이용하였다. 본 연구의 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 모든 실험 결과는 Shapiro-Wilk를 통해 정규성 검정을 수행하여 정규분포인 체중, 혈액분석 결과는 one-way ANOVA test 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였으며, 정규분포하지 않는 Mankin score는 비모수 방법인 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test를 수행하였다. 모든 결과는 $p < 0.05$ 수준에서 실험군과 대조군의 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 골담초와 골담초 추출물의 이화학적 특성

골담초 추출물을 제조하기 위해 사용된 골담초의 일반성분 및 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량은 Table 2와 같다. 골담초의 수분함량은 8.81%, 조지방 0.66%, 조단백질 17.46%, 조회분 2.02%, 총 폴리페놀 함량은 1.55 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 0.28 mg/g으로 분석되었다.

골담초 추출물의 이화학적 성분 분석 결과는 Table 3과 같다. 골담초 추출물의 조지방 함량은 0.06%, 조단백 1.28%, 조회분 0.07%로 분석되었다. pH는 5.17로 약산성을 보였으며, 당도는 5.00 °Brix로 분석되었다. Shon 등(2008)의 연구에서

Table 2. Chemical composition of *Caragana sinica*

Composition	<i>Caragana sinica</i>
Moisture (%)	8.81±0.10 ¹⁾
Crude fat (%)	0.66±0.25
Crude protein (%)	17.46±0.12
Crude ash (%)	2.02±0.05
Total polyphenolics (mg/g)	1.55±0.03
Total flavonoids (mg/g)	0.28±0.15

¹⁾ Mean±S.D.

Table 3. Physicochemical composition of *Caragana sinica* extracts

Composition	<i>Caragana sinica</i> extracts (GDC)	
Crude fat (%)	0.06±0.01 ¹⁾	
Crude protein (%)	1.28±0.17	
Crude Ash (%)	0.07±0.10	
pH	5.17±0.00	
Sugar °Brix	5.00±0.01	
Color values	L	37.90±0.61
	a	2.41±0.03
	b	8.01±0.05
Total polyphenolics (mg/g)	0.40±0.22	
Total flavonoids (mg/g)	0.22±0.23	

¹⁾ Mean±S.D.

구기자 추출물의 pH는 5.20으로 나타나 본 연구와 유사하였고, 당도는 15.0 °Brix로 보고하여 골담초 추출물보다 높았다. 골담초 추출물의 명도(lightness, L)는 37.90, 적색도(redness, a) 2.41, 황색도(yellowness, b) 8.01로 분석되었다. Park LY(2014)의 연구에서 커피박 열수추출물로 제조한 식혜의 명도(lightness, L)는 46.64, 적색도(redness, a) 1.06, 황색도 (yellowness, b) 4.53으로 보고되어 골담초 추출물의 색이 명도(lightness, L)는 낮고 적색도(redness, a)와 황색도(yellowness, b)는 높게 나타났다. 이는 골담초 뿌리 고유의 갈색이 추출물의 색에 영향을 미쳤기 때문인 것으로 생각된다.

골담초 추출물의 총 폴리페놀 함량은 0.40 mg/g으로 분석되었다. Kim 등(2012)의 연구에서 골담초를 메탄올로 추출한 후, 농축된 상태의 것을 이용한 추출물의 총 폴리페놀 함량은 88.19 mg/g으로 보고하여 본 연구의 건조된 골담초 뿌리 추출물보다 높게 나타났다. 따라서 추출물의 폴리페놀 함량은 시료의 종류 및 추출방법에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다(Park YS 2002). 폴리페놀 화합물은 플라보노이드, 안토시아닌, 탄닌, 카테킨, 이소플라본, 리그난, 레스베라트롤 등

을 총칭하며(Dai & Mumper 2010), 식물계에 널리 분포되어 있으며, 항산화, 항암 및 항염 효과가 뛰어나다(Lu & Foo 2000; Jeong 등 2016; Ha 등 2019).

골담초 추출물의 총 플라보노이드 함량은 0.22 mg/g이 분석되었다. Kim 등(2012)의 연구에서 농축된 시료를 사용한 골담초 추출물의 총 플라보노이드 함량은 39.31 mg/g으로 보고되어 본 연구의 건조된 골담초 추출물보다 높게 나타났다. Ma 등(1999)은 골담초의 플라보노이드 연구에서 acacetin-7-O-p-I-glucopyranoside을 확인, 동정하였으며, 자원 생약으로서 가치가 있음이 보고되었다.

2. 골담초 추출물의 퇴행성 관절염 효능 측정

1) 체중 및 혈청생화학적 검사

전체 실험 기간 중 실험군과 대조군을 포함한 모든 실험군에서 사망 동물은 관찰되지 않았다. 실험동물이 입수된 시점부터 실험 종료 시까지 8회에 걸쳐 체중을 측정된 결과에서도 모든 군에서 고른 체중 증가가 관찰되었고(Fig. 1), MIA를 투여한 음성대조군을 포함한 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

3주간의 섭취기간 동안 GDC의 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청 아스파테이트 아미노전이효소(AST)와 알라닌 아미

노전이효소(ALT), 신장 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청 혈액 요소질소(BUN), 크레아티닌을 분석한 결과는 Table 4와 같다.

그 결과, 아스파테이트 아미노전이효소(AST), 혈액요소질소(BUN), 크레아티닌에서는 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않았고, MIA군과 이부프로펜군의 ALT 수치가 normal control보다 유의적으로 높았으나($p=0.001$), GDC에서는 normal control과 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 GDC 섭취가 다른 실험군과 비교하여 실험동물의 체중 증가에 영향을 주지 않았으며, 간이 나 신장 지표에서도 차이가 나타나지 않음을 보여준다.

일반적으로 아스파테이트 아미노전이효소(AST), 알라닌 아미노전이효소(ALT)는 간에서 일어나는 염증반응이나 간 세포의 파괴에 대한 지표로 사용되는 효소로서 간독성이 나타나면 혈중 농도가 증가하고, 혈액요소질소(BUN)와 크레아티닌은 단백질 대사과정에서 생성되는 물질로써 신장기능에 의해 변화하는 것으로 알려져 있다(Han 등 2010). MIA를 주입한 골관절염 동물모델을 이용하여 식물 추출물의 효능을 확인한 선행연구들에서도 체중 변화와 간 지표, 신장 지표를 확인함으로써 독성을 평가하였다. Kim 등(2019)의 연구에서는 MIA를 주입하고 2주간의 약물투여 기간 동안 모든 실험군의 체중변화량에 차이가 없었으며, 식이섭취량에서 차이가 없는 것으로 산약 추출물의 섭취가 일반 독성이 없는 것

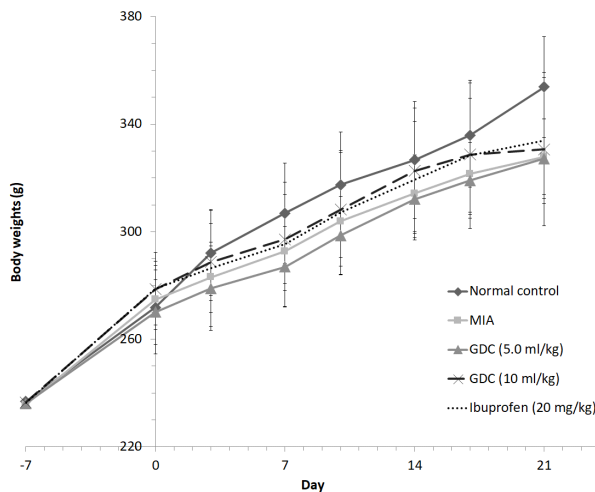


Fig. 1. Effects of GDC on changes of body weights in MIA-induced osteoarthritis. Normal control: sham operated normal control rats, MIA: MIA-induced osteoarthritis negative control rats, GDC(5.0 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 5 mL/kg body weight of GDC, GDC(10 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 10 mL/kg body weight of GDC, Ibuprofen(20 mg/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 20 mg/kg body weight of ibuprofen.

Table 4. Effects of GDC on changes of AST, ALT, BUN and CRE in MIA-induced osteoarthritis

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
Normal control ¹⁾	101.67±9.57	46.18±5.11 ^a	21.13±1.77	0.37±0.03
MIA ²⁾	111.28±10.45	53.82±5.62 ^{bc}	21.45±1.22	0.39±0.03
GDC ³⁾ (5.0 mL/kg)	101.68±8.77	47.95±4.05 ^a	20.53±1.87	0.39±0.02
GDC ⁴⁾ (10 mL/kg)	111.08±8.56	49.68±3.84 ^{ab}	20.43±1.76	0.38±0.03
Ibuprofen ⁵⁾ (20 mg/kg)	115.65±14.98	58.70±3.97 ^c	20.90±1.82	0.42±0.07

¹⁾ Normal control: sham operated normal control rats.

²⁾ MIA: MIA-induced osteoarthritis negative control rats.

³⁾ GDC(5.0 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 5 mL/kg body weight of GDC.

⁴⁾ GDC(10 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 10 mL/kg body weight of GDC.

⁵⁾ Ibuprofen(20 mg/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 20 mg/kg body weight of ibuprofen.

Values are means±S.D(n=6). Values with different letters within the same columns are significantly different($p<0.05$; one-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

으로 평가하였고, Kim 등(2018b)의 연구에서도 모든 실험군의 체중이 고르게 증가하고, 혈액 내의 아스파테이트 아미노 전이효소(AST), 알라닌 아미노전이효소(ALT)의 유의적인 변화가 없으므로 골관절염 동물모델에서 4주 동안의 상기생 추출물의 투여에는 일반 독성 및 간독성이 없는 것으로 보고하였다. 그러므로 본 연구의 결과는 3주간의 GDC 섭취가 실험동물의 체중 증가에 영향을 주지 않았으며, 간이나 신장 독성이 나타나지 않음을 의미한다고 할 수 있다.

2) 조직병리학적 검사

본 연구에서 MIA를 이용하여 퇴행성 관절염을 유발한 실험동물의 무릎 관절 조직의 손상에 대한 GDC의 골관절염 개선 효과는 Mankin score를 기준으로 평가하였으며, 결과는 Table 5와 같다. 일반적으로 MIA 주입에 의한 골관절염 동물 모델은 MIA 주입 이후 염증반응으로 인해 관절 구조의 변형과 밀도 저하가 발생하는 것으로 보고되어 있으며(Kim 등 2008; Kim 등 2018a; Kim 등 2019), 본 연구에서도 MIA 처치 3주 후 조직병리학적 검사를 시행한 결과, 교차된 혈관(tidemark integrity) 항목을 제외한 조직 구조(structure), 세포 형태(cells), 염색 정도(safranin-O) 항목에서 음성대조군의 관절 조직 손상이 MIA를 처치하지 않고, 식염수로 sham 시술을 받은 일반 대조군보다 유의적으로 높게 발생한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 MIA 주입을 통해 골관절염이 유발되었음을 조직병리학적 검사 및 평가를 통해 확인한 것으로 볼 수 있다.

세부적인 Mankin score를 이용한 효능 검정 결과를 살펴보면, GDC를 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 군의 연골 구조

점수가 음성대조군인 MIA군보다 각각 36%와 44% 낮았고, 세포 형태 점수는 각각 31%와 37% 낮았으며, 양성대조군인 이부프로펜군과도 통계적으로 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2). 또한, Safranin-O 염색에 의한 연골 손상 점수는 MIA군보다 GDC를 5 mL/kg 처리한 실험군에서 유의적으로 낮았으며 ($p<0.01$), GDC를 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 군과 이부프로펜 간의 연골 손상에도 통계적으로 유의적인 차이가 없었다. 조직에서 교차된 혈관을 확인하는 지표(tidemark)를 이용한 손상은 MIA군의 한 마리를 제외한 모든 실험동물에서 발견되지 않았으며, 모든 실험군 간의 차이가 없었다. 최종적으로 Mankin score 총점에서는 GDC를 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 실험군의 점수가 MIA군보다 통계적으로 유의하게 낮았으며($p<0.05$), 이러한 골관절염 개선 효과는 이부프로펜 군과도 유의적인 차이가 없었다.

본 연구에서 평가된 Mankin score를 바탕으로 골관절염 등급을 구분한 결과는 Table 6과 같다. 그 결과, 음성대조군인 MIA군의 실험동물 중 67%가 가장 높은 5단계 손상 수준인 완전한 연골 파괴로 분류되었으며, GDC를 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 군에서는 과반수 이상의 실험동물이 3단계 손상 수준인 심한 연골 파괴, 양성대조군인 이부프로펜 군에서는 과반수 이상의 실험동물이 2단계 손상 수준인 외부 섬유 형성으로 분류되었다. 이러한 결과는 MIA를 이용하여 골관절염을 유발한 동물모델에서 Mankin score로 조직학적 변화를 측정하여 식물 추출물의 연골 손상 완화를 관찰한 선행연구들의 결과가 유사하며, 선행 연구들에서도 실험물질을 처치한 실험군들에서 대조군에 비해 유의하게 Mankin score가 감소한 것이 치료 이후에 손상되었던 관절연골이 조직의 구조,

Table 5. Effects of GDC on changes of Mankin scores in MIA-induced osteoarthritis

Group	Structure	Cells	Safranin-O	Tidemark integrity	Total
Normal control ¹⁾	0.17±0.41 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00	0.17±0.41 ^a
MIA ²⁾	4.17±0.75 ^c	2.67±0.52 ^c	3.17±0.41 ^c	0.17±0.41	10.17±1.17 ^c
GDC ³⁾ (5.0 mL/kg)	2.67±0.52 ^{bc}	1.83±0.75 ^{bc}	2.00±0.63 ^b	0.00±0.00	6.50±0.84 ^b
GDC ⁴⁾ (10 mL/kg)	2.33±0.82 ^{bc}	1.67±0.82 ^{bc}	2.33±0.82 ^{bc}	0.00±0.00	6.33±1.75 ^b
Ibuprofen ⁵⁾ (20 mg/kg)	1.83±0.75 ^b	1.50±0.55 ^b	1.83±0.41 ^b	0.00±0.00	5.17±0.75 ^b

¹⁾ Normal control: sham operated normal control rats.

²⁾ MIA: MIA-induced osteoarthritis negative control rats.

³⁾ GDC(5.0 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 5 mL/kg body weight of GDC.

⁴⁾ GDC(10 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 10 mL/kg body weight of GDC.

⁵⁾ Ibuprofen(20 mg/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 20 mg/kg body weight of ibuprofen.

Values are means±S.D(n=6). Values with different letters within the same columns are significantly different($p<0.05$; Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons).

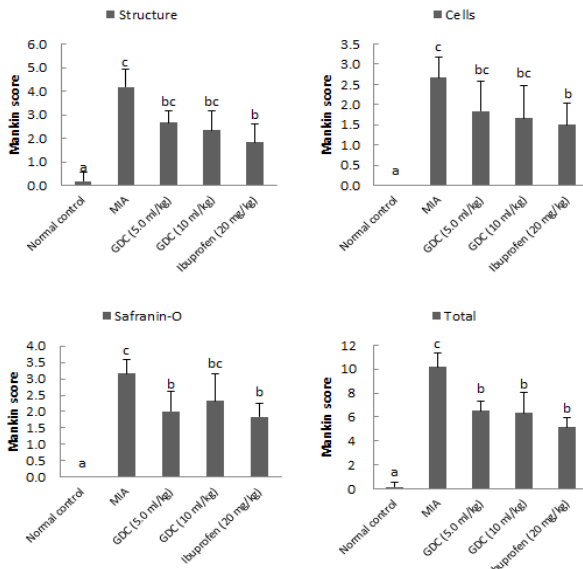


Fig. 2. Effects of GDC on changes of Mankin scores in MIA-induced osteoarthritis. Normal control: sham operated normal control rats, MIA: MIA-induced osteoarthritis negative control rats, GDC(5.0 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 5 mL/kg body weight of GDC, GDC(10 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 10 mL/kg body weight of GDC, Ibuprofen(20 mg/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 20 mg/kg body weight of ibuprofen. Different letters are significantly different($p < 0.05$; Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons).

Table 6. Osteoarthritis grade according to Mankin score

Group/Grade	Normal cartilage	Superficial fibrillation	Moderately cartilage destruction	Severely damage of cartilage	Complete loss of cartilage
Normal control ¹⁾	6	0	0	0	0
MIA ²⁾	0	0	0	2	4
GDC ³⁾ (5.0 mL/kg)	0	1	5	0	0
GDC ⁴⁾ (10 mL/kg)	0	1	4	1	0
Ibuprofen ⁵⁾ (20 mg/kg)	0	4	2	0	0

¹⁾ Normal control: sham operated normal control rats.

²⁾ MIA: MIA-induced osteoarthritis negative control rats.

³⁾ GDC(5.0 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 5 mL/kg body weight of GDC.

⁴⁾ GDC(10 mL/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 10 mL/kg body weight of GDC.

⁵⁾ Ibuprofen(20 mg/kg): MIA-induced osteoarthritis rats treated with 20 mg/kg body weight of ibuprofen.

세포의 형태, 주위 세포의 기질의 염색성 등이 어느 정도 정상 연골 조직으로 수복되어가고 있는 과정이라고 보고하였다(Kim 등 2008; Nam 등 2013). 본 연구의 결과는 GDC가 퇴행성관절염의 대표적인 증상인 연골세포의 사멸을 억제 및 연골구조의 손상 방지를 통하여 연골의 소실을 억제함으로써 퇴행성 관절염의 진행을 억제하였으며, 그 개선 효과가 양성대조 약물인 이부프로펜과 유사한 것을 의미한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 항염증, 항지혈증, 항산화 효과 등의 생리활성 효능이 있는 것으로 알려진 골담초 뿌리를 사용하여 열수 추출물을 제조하고, 이화학적 특성을 확인하고자 하였다. 또한, MIA로 유도한 퇴행성 관절염 동물모델을 이용하여 3주간의 골담초 추출물의 섭취가 퇴행성관절염 동물의 혈청생화학 및 조직병리학적 지표에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 골담초 추출물의 이화학적 특성으로는 일반적인 특성과 총폴리페놀, 총플라보노이드가 분석되었으며, MIA 동물모델은 정상대조군, 골관절염을 유발한 음성대조군, 골관절염을 유발하고 골담초 추출물을 각각 5 mL/kg과 10 mL/kg 투여한 실험군, 이부프로펜을 20 mg/kg 투여한 양성대조군으로 구성되었다. 그 결과, 골담초 추출물의 조직방 함량은 0.06%, 조단백 1.28%, 조회분 0.07%로 분석되었고, pH는 5.17로 약산성을 보였으며, 당도는 5.00 °Brix로 분석되었다. 골담초 추출물의 명도(lightness, L)는 37.90, 적색도(redness, a) 2.41, 황색도(yellowness, b) 8.01으로 나타났으며, 총 폴리페놀 함량은 0.40 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 0.22 mg/g으로 분석되었다.

MIA로 유도된 관절염 동물모델에서 3주간 골담초 추출물을 섭취한 모든 실험군의 체중이 고루 증가하였으며, 간이나 신장 지표에 독성이 나타내지 않았다. 또한, Mankin score를 통한 조직병리학적 검사에서는 골담초 추출물을 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 실험군의 무릎관절 조직 손상 정도가 음성대조군보다 통계적으로 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 골관절염 등급에서도 골담초 추출물을 5 mL/kg 또는 10 mL/kg 급여한 실험동물의 조직 손상 수준이 음성대조군보다 개선된 것으로 평가되었다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 배화여자대학교 학술연구비를 지원받아 수행된 연구임.

References

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 15th ed. pp.777-788.

Association of Official Analytical Chemists

- Belia S, Pietrangelo T, Fulle S, Menchetti G, Cecchini E, Felaco M, Vecchiet J, Fano G. 1998. Sodium nitroprusside, a NO donor, modifies Ca²⁺ transport and mechanical properties in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 19:865-876
- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352
- DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. 2005. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 6th ed. pp.1860-1862. McGraw-Hill
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Bio Chem* 12:239-249
- Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. 2011. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J Knee Surg* 24:251-264
- Gwak JH, Kim IH. 1974. The studies on the anti-inflammatory activity of *Caragana sinica* root. *Korean J Pharmacogn* 5:179-185
- Ha GJ, Kim HY, Ha IJ, Cho SR, Moon JY, Seo GI. 2019. Quality and antioxidant properties of fermented sweet potato using lactic acid bacteria. *Korean J Food Nutr* 32:494-503
- Ha KY, Chang CH. 1999. Effect of estrogen receptor on degenerative change and displacement of facet joint. *Korean J Soc Spine Surg* 6:1-7
- Han ZZ, Xu HD, Kim KH, Ahn TH, Bae JS, Lee JY, Gil KH, Lee JY, Woo SJ, Yoo HJ, Lee HK, Kim KH, Park CK, Zhang HS, Song SW. 2010. Reference data of the main physiological parameters in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Lab Anim Res* 26:153-164
- Hwang GJ, Kim IH. 1983. Anti-inflammatory and analgesic activities of the root of *Caragana kpreana*. *Korea J Pharmacogn* 14:140-146
- Jeon YS, Jo BS, Park HJ, Kang SA, Cho YJ. 2012. Screening of biological activity of *Caragana sinica* extracts. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 41:1211-1219
- Jeong YP, Yoon YC, Yoon DH. 2007. Effects of herbal acupuncture (*Crataegus pinnatifida*) at BL21 on the obese rats induced by high fat diet. *Korean J Acupunct Moxib Soc* 24:55-68
- Jeong YS, Lee SH, Song J, Hwang KA, Noh GM, Jang DE, Hwang IG. 2016. Phytochemical contents and antioxidant activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Korean J Food Nutr* 29:767-776
- Kalbhenn DA. 1987. Chemical model of osteoarthritis: A pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 14:130-131
- Kim EJ, Choi JY, Yu Miri, Kim MY, Lee Sh, Lee BH. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 44:337-342
- Kim EJ, Chung HW, Kim GY. 2008. Effect of *Achyranthis radix* and ultrasound in osteoarthritis rats articular cartilage. *Korean J Physiol Pathol Med* 22:390-396
- Kim EN, Roh SS, Jeong GS. 2018a. Inhibitory effect of *Sparassis crispa* (Wulf.) extract on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis. *Korean J Pharmacogn* 49:262-269
- Kim GS, Park GS. 2012. Quality characteristics of Sikhe prepared with *Cnidium officinale* Makino water extracts. *Korean J East Asian Soc Diet Life* 22:868-878
- Kim JS, Lee AY, Moon BC, Kim HS, Kim WJ, Kim C, Choi G, Kim SH, Chun JM. 2018b. Effects of aqueous extract from *Taxillus chinensis* on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Korean J Herbol* 33:81-88
- Kim MG, Seo IB, Leem KH, Jeong T, Kim JS. 2017. Effects of *Achyranthis japonica radix*-containing mixture on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Korean J Herbol* 32:83-89
- Kim MJ, Park HJ, Kim KJ, Lee JA, Shin MR, Roh SS. 2019. Protective effect of *Dioscoreae rhizoma* extracts in MIA-induced rat. *Korean J Herbol* 34:27-35
- Kumar V, Al-Abbasi FA, Ahmed D, Verma A, Mujeeb M, Anwar F. 2015. *Paederia foetida* Linn. inhibits adjuvant induced arthritis by suppression of PGE(2) and COX -2 expression via nuclear factor-κB. *J Food Funct* 6:1652-1666
- Lee HS. 2014. Prevalence of osteoarthritis and related risk factors in the elderly: Data from the fifth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V), 2010-2012. *Korean J Diet Assoc* 20:99-109
- Lee SC, Chung SI, Kang MY. 2016. Effects of a *Caragana sinica* water extract on lipid and glucose metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Plant Resour* 29:532-538
- Lee YB, Yoo SJ, Kim JS, Kang SS. 1990. Saponins from the roots *Caragana chamlagu*. *Korean J Pharmacogn* 21:193-199
- Lu Y, Foo LY. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *J Food Chem* 68:81-85
- Ma CW, Ham IH, Whang WK. 1999. The flavonoids from *Camgana chamlagu* leaves. *Yakhak Hoeji* 43:143-149

- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114
- Nam DE, Kim OK, Lee J. 2013. Therapeutic effects of *Curdrania tricuspidata* leaf extract on osteoarthritis. *Korean J Food Sci Nutr* 42:697-704
- Park JS, Cha DS, Jeon H. 2016. Anti-nociceptive activity of methanolic extract of *Caragana sinica*. *Korean J Pharmacogn* 47:38-42
- Park LY. 2014. Quality characteristics and antioxidant activity of *Sikhe* prepared using hot water extracts of roasted coffee ground residue. *Korean J Food Sci Technol* 46:470-476
- Park YS. 2002. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *Korean J East Asian Soc Diet Life* 12:23-31
- Pearson RG, Kurien T, Shu KSS, Scammell BE. 2011. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis - reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthr Cartil* 19:324-331
- Seok JH, Lee SY, Chae EJ, Choi SW. 2010. Skin whitening effects of *Caragana sinica* Rehder extract fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913. *J Soc Cosmet Sci Korea* 36:207-213
- Shen Y, Jin L, Xiao P, Lu Y, Bao J. 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *J Cereal Sci* 49:106-111
- Shon HK, Lee YS, Park YH, Kim MJ, Lee KA. 2008. Physico-chemical properties of Gugija (*Lycii fructus*) extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 24:905-911
- van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. 1989. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol* 135:1001-1014
- Whang HJ, Han WS, Yoon KR. 2001. Quantitative analysis of total phenolic content in apple. *Anal Sci Technol* 14:377-383
- Witter J, Dionne, RA. 2004. What can chronic arthritis pain teach about developing new analgesic drugs? *J Arthritis Res Ther* 6:279-281
- Yang JW, Kim YE, Lee KH. 2015. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of *Sikhye* made with pigmented rice. *J East Asian Soc Diet Life* 25:830-841

Received 08 October, 2019
Revised 18 November, 2019
Accepted 28 November, 2019