



Original Article / 원저

홍삼·백년초 복합물이 관절염 개선에 미치는 효과

이승현¹, 이창현², 김홍준², 김영식², 신민지¹, 김지현¹, 마상용¹, 이세연³, 권진⁴, 오찬호^{1*}

¹우석대학교 식품생명공학과, ²우석대학교 한의과대학, ³우석대학교 한약학과,
⁴한국복지대학 의료보장구과

Effects of red ginseng and Baeknyeoncho complex on the arthritis improvement

Seung-Hyeon Lee¹, Chang-Hyun Lee², Hong-Jun Kim², Young-Sik Kim², Min-Ji Shin¹,
Ji-Hyun Kim¹, Sang-Yong Ma¹, Se-Youn Lee³, Jin Kwon⁴, Chan-Ho Oh^{1*}

¹Department of Food & Biotechnology, Woosuk University

²College of Korean Medicine, Woosuk University

³Department of Korean Pharmacy, Woosuk University

⁴Department of Prosthetics and Orthotics, Korean National College of Welfare

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to evaluate the efficacy of a complex mixture of natural substances of ginseng and baeknyeoncho on the arthritic rats.

Methods : *In vitro* experiments were conducted to ensure the stability of the complex. After setting toxicity and concentration by MTT assay, the antioxidant effect was measured through DPPH and ABTS radical scavenging activity. To confirm the anti-inflammatory effects of the complex, levels of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) were measured in LPS-treated macrophage cell lines (RAW264.7). We injected monosodium iodoacetate (MIA) 50 μ l (60 mg/ml) into knee joints of rats to induce osteoarthritis. The rats were divided into three groups (normal (n=5), control (n=5), and OR (n=5) group). The control group consumed 2 mg/kg of physiological saline once a day for 4 weeks, and the OR group was mixed at a concentration of 416.5 mg/kg of Baengnyeoncho (O) and 208.25 mg/kg of red ginseng (R) and ingested 1 mL each 5 days a week.

Results : This complex increased the DPPH and ABTS radical scavenging rate. The complex decreased NO production and pro-inflammatory cytokine production of macrophages. In the OR group, the secretion of cytokine in serum was

decreased. In histopathological examination, the joint tissue of the composite showed less damage to the synovial membrane, cartilage, and fibrous tissue than the control group.

Conclusions : As a result of this study, natural complexes have antioxidant, anti-inflammatory and cartilage protection effects. Therefore, we expect the complex to be effective in treating osteoarthritis.

Key words : arthritis, red ginseng, baeknyeoncho, histopathology staining, macrophage.

I. 서론

현대사회는 노인 인구가 증가하고 있는 고령화사회이며, 이와 관련된 질병과 그에 맞는 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 2017년 보건복지부에서 발표한 노인실태조사에 따르면 노인 유병률 1위인 고혈압에 이어 골관절염이 33.1%의 유병률로 2위를 차지했다¹⁾. 관절염에는 여러 종류가 있지만 그중 가장 흔한 것은 퇴행성 관절염(골관절염)이다. 골관절염은 뼈끝을 감싼 연골이 닳아 발생하고 관절 주변의 활액막에 염증이 생겨서 통증과 변형이 발생하는 질환이며 골관절염으로 인한 통증은 운동장애를 초래하여 삶의 질을 저하시킨다. 그러나 골관절염의 원인으로는 유전적 요인, 비만, 관절의 회상, 염증으로 인한 연골 손상 등으로 보아 골관절염이 반드시 나이가 들면서 발생하는 질환 아니라는 것이 나타났다. 최근 5년간 연령별 관절염 점유율을 보았을 때 30, 40대 각각 54.6%, 67.9%의 높은 비율을 차지함에 따라 젊은 층 역시 방심할 수 없는 질병으로 떠오르고 있다²⁾.

골관절염의 치료로는 약물치료, 물리 치료, 수술 치료 등이 있다. 약물로는 진통제나 비스테로이드계 소염제를 사용하여 통증과 염증을 억제하지만 장기적인 복용은 위장관 장애 간기능 장애 등의 부작용을 가져올 수 있다³⁾. 이런 화학적인 치료제의 부작용이 드러나면서 효과 좋은 천연물 치료제 개발에 대한 필요성이 강조되었고, 천연물의 기능성을 이용한 건강 기능식품 원료개발의 필요성이 증대되고 있다^{4,5)}.

홍삼은 오가피나무과 인삼속에 속하는 인삼 4-6년 근을 증기로 찐 다음 건조시킨 것으로 이 과정에서 백삼 또는 수삼과는 다른 성분이 생성된다고 알려져 있으며, 항염증 효능이 인삼 자체보다 홍삼에서 뛰어난 것을 알려져 있다⁶⁾.

백년초(*Opuntia ficus-indica*)는 부채선인장속(*Opuntia*) 선인장과 다육식물로 열매가 있고 줄기가 손바닥 모양처럼 생겼으며 천년초라 불리는 자단선인장과 함께 제주도에서 자생하는 귀화종 선인장류이다^{7,8)}. 백년초의 효능으로는 항산화, 항균효과 외에도 자궁경 부암에 대한 항암효과 등이 알려져 있다^{9,10)}.

본 연구에서는 이와 같은 항염증 효능이 입증된 천연물들을 혼합한 복합물의 항산화 및 항염증 효능을 in vitro 실험을 통해 검증하였으며 monosodium iodoacetate (MIA)로 골관절염이 유발된 흰쥐에 복합물을 경구 투여하여 항관절염 효능을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 백년초(*Opuntia ficus-indica*)는 담양아문약초에서 구입하여 실험에 필요한 농도로 용매와 함께 초음파로 추출(30℃, 1시간) 후 감압 여과(pore size: 5 μ m)하여 사용하였다. 농협에서 구매한 홍삼(Red ginseng) 300 g에 증류수 2 L을 넣고 초음파로 추출(100℃, 5시간)하여 얻어진 추출물을 감압여과(pore size: 5 μ m)한 후 동결 건조하여 분말 시료를 얻었으며¹¹⁾, 추출물들은 4℃에서 보관, 동물실험 시에는 0.9% saline으로, 세포실험 시에는 PBS를 용매로 사용하였다.

2. 세포주 및 실험동물

실험에 사용된 세포주(RAW264.7)는 한국세포주은행에서 분양받았고, 동물은 수컷 6주령의 Sprague Dawley(170-200 g) rat을 다물사이언스에서 분양받아 사용하였다. 실험 당일까지 고형사료 및 물을 충분히 공급하고, 사육실 환경은 온도 23 \pm 2℃, 습도

*Corresponding author : Chan-Ho Oh, Woosuk University, 443, samnye-ro, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55338, Republic of Korea.
Tel : +82-63-290-1431, E-mail : choh@woosuk.ac.kr

•Received : April 1, 2021 / Revised : April 7, 2021 / Accepted : April 9, 2021

60±10%로 일정하게 관리했으며 light/dark 12시간의 사육환경에서 1주간 적응시켰다. 본 실험은 우석대학교 실험동물윤리위원회 승인(WS-2020-03)하에 실시하였다.

3. 실험 방법

1) 세포독성 (MTT) 측정

RAW264.7세포를 96 well plates에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 4시간 동안 배양한 후, O (백년초 추출물), R (동결건조된 홍삼), OR (백년초와 홍삼 복합물)을 처리하여 24시간 37°C, CO₂ incubator에 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 MTT solution(5 mg/ml in PBS)을 20 µl/well 처리, 4시간 후 10% SDS(+ 0.01N HCl) 100 µl를 가하여 18시간 빛을 차단하며 반응시켰으며 microplate reader로 각 well 흡광도를 570nm에서 측정하였다.

2) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 Blois 방법(Blois 1958)으로 측정하였다¹¹⁾. 주정에 용해 시킨 0.2mM의 DPPH 용액 180 µl와 각 시료를 20 µl씩 혼합하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 528nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군으로는 PBS를, DPPH 용액의 대조군으로 주정을 넣어 보정 값을 얻었다. DPPH radical 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \{1 - (\text{sample} - \text{blank}) / \text{control}\} \times 100$$

3) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS radical 소거능은 Jeong 등의 방법을 96 well에 맞게 변형하여 측정하였다¹²⁾. 실험방법은 증류수에 용해한 7mM의 ABTS와 2.45mM potassium persulfate을 1:1로 넣어 OD값이 0.6이 되도록 증류수에 희석(pH 7.4)하여 16시간 동안 암소에 방치한다. 희석된 ABTS solution 50 µl에 각 sample 50 µl씩 가하여 5분 동안 반응시킨 후 734nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \{1 - (\text{S} - \text{SC}) / (\text{BS} - \text{BC})\} \times 100$$

S: sample (sample/ABTS+)

SC: control (H₂O/ABTS+)

BS: blank of sample (sample/ H₂O)

BC: blank of control (H₂O/H₂O)

4) 세포 내 NO 생성 측정

RAW264.7세포를 12 well plates에 8×10⁵ cells/well로 분주하여 추출물과 함께 1시간 배양한 후 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 상등액과 Griess reagent를 1:1의 비율로 실온에서 혼합한 후 microplate reader로 540nm에서 측정하였고, sodium nitrite를 사용하여 표준곡선을 얻었다.

5) 세포 내 염증성 cytokine 생성 측정

RAW264.7세포를 12 well plates에 8×10⁵ cells/well로 분주하여 4시간 배양한 후, 백년초(O), 홍삼(R), 복합물(OR)을 처리하고 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후 세포배양액을 수거한 후 ELISA kit를 이용하여 cytokine(IL-1β, TNF-α)을 450nm에서 측정하였다¹³⁾.

6) 관절염 유발 및 실험군 분류

Avertin 2 ml 와 Rompun 0.1 ml로 rat을 마취시킨 다음 오른쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모하여 골관절염 유발 물질인 monosodium iodoacetate(MIA)를 30G의 needle로 왼쪽 무릎 관절 내에 50 µl(60 mg/ml)씩 투여하였다. MIA 희석 용매로는 0.9% saline을 사용하였다. 관절염 유발 여부는 MIA 투여 7일 후에 확인하여 관절염이 유발된 동물만을 대조군, 실험군으로 나누었으며 MIA를 투여하지 않은 동물을 정상군으로 나누었다. 각 군당 rat은 5마리씩으로 하였다. 약물 투여는 흰쥐(Sprague Dawley rat) 무릎 슬관절에 MIA를 주사하여 관절염 여부를 확인한 이후부터 1일 1회 매일 같은 시간에 대조군에는 생리식염수 2 mg/kg을, 실험군 OR의 경우 백년초(O) 416.5 mg/kg과 홍삼(R) 208.25mg/kg의 농도로 혼합한 복합물을 4주간 주 5회 1 ml씩 경구 투여하였으며 모든 군에서 자유 식이와 음수를 실시하였다.

7) 혈액 내 염증성 cytokine 생성

4 주간의 실험 기간이 종료된 후 모든 실험동물을 12시간 절식시킨 다음 diethyl ether로 마취하여 복부와 흉강을 절개해 심장채혈 하였다. 채취한 혈액은 실온에 30분간 방치시켜 층 분리가 된 것을 확인한 후 10분간 원심 분리 (3,000 rpm, 4℃)하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 ELISA를 사용하여 IL-1 β , TNF- α 를 측정하였으며 방법은 세포 cytokine 측정법과 동일하다.

8) 조직병리학적 검사

실험이 끝난 흰쥐의 왼쪽 무릎 부위를 절단하여, 10% formalin 용액 (in 10% EDTA)에 넣어 관절조직을 탈회(decalcification)시켰다. 탈회 과정이 끝나고 나면 파라핀 왁스에 관절조직을 넣고 고정하여 포매시킨 후 관상절단(coronal section)을 실시하였다. 파라핀으로 고정된 조직을 7 μ m의 크기로 자른 뒤, slide glass로 옮겨 건조시킨다. 건조가 완료된 관절 조직들로 염증반응 발생 유무나 활막세포의 증식의 여부는 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을, 연골 조직의 손상 여부는 proteoglycan층을 염색하는 Safranin-O 염색을 진행하여 결과를 확인할 수 있다.

4. 통계분석

본 연구의 모든 데이터는 평균±표준편차(Mean±SD)로 표시하였고, SPSS 22.0 ver for windows를 이용하여 통계처리 하였다. 각 실험군 간 평균의 차이를 비교하기 위해 일요인분산분석(one-way ANOVA)를 적용하였으며, Duncan's multiple range test (DMRT)을 사용해 사후 분석을 실시하였다. 각각의 결과 분석시 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 대식세포(RAW264.7) 생존율에 미치는 효과

개별 추출물과 복합물의 항염증 효과를 확인하기 위한 적정 샘플처리 농도를 구하기 위해 먼저 대식세포에 대한 세포 생존율을 MTT법을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포주에 홍삼 및 백년초 추출물을 10 - 1000 μ g/ml의 농도로 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 1A 에서 백년초(O)는 모든 농도에

서, 홍삼(R)은 100 μ g/ml 농도 이하에선 세포독성이 나타나지 않았으나 홍삼 추출물 500 μ g/ml 이상 농도에서부터는 세포독성이 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1A). 이는 백년초와 홍삼의 세포 생존률에 대한 기존 연구결과와 유사하였으며 (Lipopolysaccharide로 유도된 RAW264.7 세포에서 MAPK에 의한 홍삼 추출물의 항염증 효과, 손바닥선인장(백년초, 천년초) 열매 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성) 이를 토대로 개별 추출물을 혼합한 복합물의 처리 농도를 예측할 수 있었다. 개별 추출물 실험 결과를 토대로 적정 농도를 혼합한 복합물로 세포독성을 측정해본 결과 홍삼 50 μ g/ml, 백년초 100 μ g/ml 농도로 혼합한 복합물에서 가장 높은 세포 생존율을 보였다(Fig. 1B). 이후 추출물 각각의 농도와 복합물의 세포독성을 측정하였고, 복합물이 더 높은 효과를 보여(Fig. 1C) 이 농도로 이후 항염증 관련 실험을 진행하였다.

2. 항산화 활성에 미치는 효과

DPPH radical 소거 활성과 ABTS radical 소거 활성은 항산화 활성을 측정할 때 많이 이용된다. DPPH는 DPPH free radical 분자가 항산화능이 있는 물질과 반응하면 phenoxy radical을 생성해 안정한 분자로 전환하여 보라색의 DPPH가 노란색으로 탈색시키는 원리로 DPPH radical 소거능이 클수록 노란색을 띤다. ABTS는 peroxidase, H₂O₂와 반응시켜 ABTS+ 이 형성 되면 시료 추출물의 항산화 물질에 의해 ABTS+ 라디칼이 제거되어 고유의 색인 청록색이 탈색되는 원리로 측정되며 이 변화를 흡광도 값으로 나타내어 radical 소거 활성을 측정할 수 있다. DPPH radical 소거능을 측정한 결과 홍삼·백년초 복합물의 소거능(28.7 \pm 1.0%)이 홍삼(17.9 \pm 0.7%)과 백년초(18.8 \pm 1.9%)의 소거능과 비교해 봤을 때 높은 소거 활성을 나타냈다(Fig. 2A). 또한 ABTS radical 소거 활성 역시 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 측정할 때 많이 이용된다. 시료들의 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 백년초와 홍삼에서는 각각 75.9 \pm 5.0%, 67.3 \pm 0.9% 측정되는 반면 홍삼·백년초 복합물에서는 97.5 \pm 0.7%로 높은 소거 활성을 나타냈다(Fig. 2B). 이러한 결과는 백년초가 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량이 높아 라디칼 소거 활성이 높고⁷⁾, 인삼의 열처리 과정에서 총페놀 함량이 증가하여 홍삼 및 흑삼의 라디칼 소거능이 인삼보다 뛰어나다는 기

존 연구들과 유사한 경향을 나타내었다¹⁴⁾.

3. NO 생성에 미치는 효과

과잉 생산된 NO는 염증반응 촉진 및 염증 매개물질의 생합성을 촉진시킨다. 따라서 NO의 생성억제는 염증 치료의 중요한 매개 역할을 한다는 것을 알 수 있다¹⁵⁾. 홍삼·백년초 복합물이 NO 생성을 억제하는지 살펴보기 위해 먼저 RAW264.7세포에 추출물과 LPS 1 µg/ml를 처리한 후 24시간 뒤 Griess reagent 시약을 사용하여 NO 생성억제 효과를 확인하였다. 홍삼·백년초 복합물의 NO 생성 저해 활성효과를 측정된 결과는 Fig. 3A와 같다. LPS를 1 µg/ml 농도로 처리한 군(C)을 100%로 두고 LPS를 처리하지 않은 군(N)은 27.0±0.6%의 낮은 NO 값을 나타내었고 백년초, 홍삼, 복합물을 처리했을 때 각 농도별로 96.6±0.7%, 90.2±2.8%, 80.75±2.3%로 확인되었다. 홍삼·백년초 복합물이 NO 생성을 더 억제하는 것으로 보아 항염증 효과가 더 높은 것으로 사료된다. 이러한 결과는 백년초의 열매, 줄기 추출물, 인삼, 홍삼 및 흑삼 추출물의 NO 생성 억제에 대해 보고한 기존 연구와 유사하며^{7,14)}, 본 실험의 결과는 두 소재를 복합한 홍삼·백년초 복합물의 NO 생성 억제 효과가 개별 추출물보다 뛰어남을 의미한다.

4. 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 효과

LPS 자극에 활성화된 대식세포는 염증 매개 물질인 전염증성 사이토카인을 생산한다¹⁶⁾. 따라서 본 실험에서는 개별 추출물과 그 복합물의 염증 매개 물질에 미치는 영향을 확인하기 위해 LPS로 자극된 대식세포에 추출물들을 가하여 염증 관련 사이토카인(IL-1β, TNF-α)의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 염증성 사이토카인 분비 억제에 대한 홍삼·백년초 복합물의 효과를 확인한 결과, IL-1β의 경우 LPS를 처리한 대조군(C)이 438.9±14.5 pg/ml, LPS 처리하지 않은 정상군(N)은 70.3±2.5 pg/ml로 약 6.2배 높은 IL-1β를 생성하였으며 추출물들은 각각 백년초 411.3±8.9 pg/ml, 홍삼 419.9±5.0 pg/ml, 홍삼·백년초 복합물 386.8±14.7 pg/ml로 복합물의 IL-1β 생성량이 제일 적었다(Fig. 3B). TNF-α의 경우 LPS를 처리한 대조군(C)이 1342.9±12.5 pg/ml, LPS 처리하지 않은 정상군(N)은 463.8±25.1 pg/ml로 약 2.9배 높은 TNF-α를 생성하였으며 추

출물들은 각각 백년초 1332.2±10.7 pg/ml, 홍삼 1315.8±27.5 pg/ml, 홍삼·백년초 복합물 1282.6±17.7 pg/ml로 복합물의 TNF-α 생성량이 제일 적었다(Fig. 3C). 본 실험에서 백년초 추출물은 증가된 TNF-α 생성량을 유의하게 억제하지 못했는데, 이러한 결과는 백년초 열매 추출물과 손바닥 선인장 잎에서 분리한 taxifolin을 이용해 마우스 대식세포에서 염증인자 발현을 확인한 선행 연구들에서 IL-6, IL-1β 발현량은 유의하게 감소시켰으나 TNF-α 발현량에는 영향을 미치지 못한 결과와 일치한다^{7,17)}. 따라서, LPS 처리된 RAW264.7세포에서 생성이 증가된 사이토카인(TNF-α, IL-1β)이 시료 투여에 의해 억제되어 개별 추출물 및 복합물이 항염증 효과를 나타냄을 확인하였으며 그 중 홍삼·백년초 복합물이 탁월한 염증 억제 효과를 나타내었다.

5. 혈청내 염증성 cytokine 생성에 미치는 효과

대식세포에서 항염증 효과를 확인한 홍삼·백년초 복합물의 관절연골 보호 효과를 MIA 유도 골관절염 유도 동물모델에서 확인하였다. MIA를 관절강에 주입하면 관절연골세포 해당과정 중 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase가 억제되어 관절연골 대사를 감소시키며, 관절연골의 변성이 유발되어 골관절염이 유도된다. 이러한 MIA 유도 골관절염 모델은 인체의 골관절염 증상인 관절연골 손상, 통증, 기능장애 등이 유사하여 골관절염 실험물질 평가에 널리 사용되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. MIA 유도 골관절염 동물모델에서 MIA 처리군은 TNF-α, IL-1β 등 염증 유발 사이토카인의 혈중 농도가 증가하게 된다. TNF-α는 세포활동에 관여하는 사이토카인으로 관절염이 발현되면 TNF-α가 과다 분비되어 염증 매개물질의 분비를 촉진시켜 염증을 증폭시키며 이로 인해 활막세포의 증식과 proteoglycan 소실을 일으켜 연골을 손상시킨다^{21,22)}. IL-1β는 연골세포로부터 산화질소 생성 및 분비를 촉진시켜 연골기질의 파괴를 증가시킨다. 이러한 사이토카인의 발현 증가는 면역세포를 활성화하고 면역인자 분비를 증가시켜 염증 반응을 유도한다^{23,24)}. 이와 같은 염증 사이토카인 IL-1β, TNF-α의 생성을 복합물이 얼마나 억제할 수 있는가를 측정하기 위해 흰쥐 무릎 슬관절에 관절염 유도 물질인 monosodium iodoacetate (MIA)를 주사한 후 샘플을 구강투여하여 혈액을 얻었다. 혈액 내 염

증 사이토카인 생성 억제에 대한 홍삼·백년초 복합물의 효과를 확인한 결과, IL-1 β 에서는 MIA 처리된 대조군(C)이 288.2 \pm 27.4 pg/ml, MIA 처리하지 않은 정상군(N)과 복합물(OR)은 각각 224.5 \pm 2.9 pg/ml, 235.6 \pm 9.4 pg/ml로 IL-1 β 생성량이 대조군에 비해 적었다(Fig. 4A). TNF- α 의 경우 대조군(C)이 38.6 \pm 0.8 pg/ml, 정상군(N)과 복합물(OR)은 각각 26.7 \pm 1.2 pg/ml, 31.5 \pm 0.4 pg/ml로 TNF- α 생성량이 대조군에 비해 유의하게 적었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 LPS 유도 대식세포에서 생성이 증가된 사이토카인(TNF- α , IL-1 β)을 감소시켰던 복합물의 실험 결과와 일치한 것으로, 이를 통해 복합물이 관절염이 유도된 대조군보다 사이토카인 생성을 억제하는 것을 알 수 있으며, 관절염이 유발되지 않은 정상군과 유사한 혈중 사이토카인 양을 생성하는 것으로 보아 항관절염 효능이 있다고 사료된다.

6. 조직병리학적 변화에 미치는 효과

1) Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

MIA 유도 골관절염 모델은 MIA 주입에 의해 염증 반응이 활성화 되어 관절연골의 구조가 변형되고 밀도가 저하된다고 보고되어 있다²⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 Rat 무릎 슬관절 내 염증반응 발생 여부나 염증세포의 조직 침윤 여부, 활막 세포의 증식을 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시하였으며 시험 결과, 정상군(N)의 활막, 연골, 섬유조직의 변형이 없었다. 골관절염이 유발된 대조군(C)과 OR군에서는 활막 및 섬유조직의 손상이 일어났으나 대조군에 비해 OR군에서 활막, 연골, 섬유조직의 변형이 개선되었다 (Fig. 5A).

2) Safranin-O 염색

Proteoglycan은 무릎 연골조직의 유연성과 탄력성을 유지하며, proteoglycan membrane을 형성하여 연골과 골이 손상되지 않게 보호한다^{26,27)}. 따라서 proteoglycan의 손상 여부를 알아보기 위해 Safranin-O 염색을 실시한 결과, 정상군의 관절조직에서는 proteoglycan이 붉은색으로 염색되어 있었던 반면 대조군의 관절조직에서는 붉은색이 관찰되지 않았다. 복합물 처리군인 OR군에서는 대조군에 비해 proteoglycan이 붉은색으로 염색되어 있는 것으로 나타나 홍삼·백년초 복합물 투여로 인해 연골세포의 손상이 억제

된 것으로 사료된다(Fig. 5B). H&E 염색과 Safranin-O 염색을 통해 확인한 슬관절 내 조직학적 변화에 대한 홍삼·백년초 복합물의 영향을 종합하면, 홍삼·백년초 복합물은 무릎의 활막, 섬유, 연골조직 및 proteoglycan membrane의 손상을 억제하여 관절염을 억제하는 것으로 생각된다.

IV. 결론

홍삼, 백년초 및 그 복합물이 골관절염에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW264.7 세포와 MIA 유도 골관절염 흰쥐 모델을 이용하여 라디칼 소거능, NO, IL-1 β , TNF- α , 관절연골의 병리조직학적 변화 관찰을 통해 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 홍삼, 백년초 추출물과 그 복합물은 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성을 나타냈으며, 개별 추출물에 비해 복합물이 더 뛰어난 소거능을 나타내었다.
2. LPS 를 처리한 RAW264.7 세포에서 홍삼, 백년초 추출물과 그 복합물은 NO, IL-1 β , TNF- α (백년초 추출물 제외) 생성을 유의하게 억제했으며, 개별 추출물에 비해 복합물이 더 뛰어난 억제 활성을 나타내었다.
3. MIA 유도 골관절염 흰쥐 모델에서 홍삼·백년초 복합물 투여는 혈중 IL-1 β , TNF- α 생성을 유의하게 억제시켰다.
4. MIA 유도 골관절염 흰쥐 모델에서 홍삼·백년초 복합물 투여는 무릎의 활막, 섬유, 연골조직 및 proteoglycan membrane의 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 보아 홍삼과 백년초 복합물은 항산화, 항염증 작용이 있으며, 활막, 연골 및 섬유조직 등의 손상을 억제하여 관절을 보호하는 효능이 있어 향후 골관절염 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

References

1. Jung KH, Oh YH, Kang EN, Kim KR, Lee YK, Oh MA, Hwang NH, Kim SJ, Lee SH, Lee SG, Hong SY. Profiles of Older People Survey in Korea. Korea Institute for Health and Social Affairs. 2017.



2. Health Insurance Review & Assessment Service. Beware of 'Knee Arthrosis' among middle and old people on a spring outing. Health Insurance Review & Assessment Service. 2014.
3. Lee H, Yoon SB, Shin SH, Jeong JM. Effect of Mulberry Extract Complex on Degenerative Arthritis In Vivo Models. J Korean Soc Food Sci Nutr 2016;45(5):634-41.
4. Lee JW, Do JH. Market trend of health functional food and the prospect of ginseng market. J Ginseng Res 2005;29:206-14.
5. Kim HK. Current status and prospect of nutraceuticals. In Proceedings of the Korean Society of Life Science Conference 2004:29.
6. Ku SK, Choi HY. Antioxidant activity and quality characteristics of red ginseng sweet jelly (Yanggaeng). Korean J Food Cook Sci 2009;25(2): 219-26.
7. Kim D-G, Shin J-H, Kang M-J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia humifusa* fruits ethanol extracts. Korean J Food Preserv 2018;25(5):586-94.
8. Kim JY, Lim MK. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Alone or Combined with Vitamin C. J Korean Soc Food Sci Nutr 2019;48(6): 613-21.
9. Chung HJ. Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica* var. *saboten*. Korean J Soc Food Sci, 2000;16(2):160-6.
10. Seo KI, Yang KH, Shim KH. Antimicrobial and antioxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* extracts. Korean J Postharvest Sci Technol, 1999;6(3): 355-9.
11. Kim HR, Lee CH, Lee SH, Kim JH, Shin MJ, Ahn CR, et al. Anti-obesity effects of cultivated ginseng, -wild ginseng and -red ginseng extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr Conference 2019:462.
12. Kim JS, Kim KL. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Artemisiae Capillaris* extract. Kor J Aesthet Cosmetol 2015;13(6): 805-12.
13. Kim MS, Kim NS, Kwon J, Kim HR, Lee DY, Oh MJ, et al. Anti-inflammatory and Immune Regulatory Effects of *Aucklandia lappa* Decne 70% Ethanol Extract. Korean J Medicinal Crop Sci 2018;26(1):8-18.
14. Jang A-Y, Seung Y-C, Ji J-G, The comparative study on physiological activity of White ginseng, Red ginseng and Black ginseng extract. Journal of Digital Convergence 2016; 14(5):459-71.
15. Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY, Kim HJ. Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264. 7 cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 2012;41(11):1645-8.
16. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. J Immunol 2006;176(6):3635-41.
17. Kim J, Lee Y, An H-J, Lee J-D, Yi Y. Anti-inflammatory activities of taxifolin from *Opuntia humifusa* in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 murine macrophages. J Appl Biol Chem 2015;58(3):241-66.
18. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial Joints: An animal model of osteoarthritis. Toxicol Pathol 2003; 31(6):619-24
19. Combe R, Bramwell S and Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. Neurosci Lett 2004;370(2-3):236-40.
20. Kim GS, Kim HJ, Lee DY, Choi SM, Lee SE, Noh HJ, et al. Effects of Supercritical Fluid Extract, Shikonin and Acetylshikonin from *Lithospermum erythrorhizon* on Chondrocytes and MIA-Induced Osteoarthritis in Rats. Korean J Medicinal Crop Sci 2013;21(6):466-73.
21. Lee EJ, Oh MS. Effects of Keonbodan (健步丹) on MIA-Induced Osteoarthritis in Rat. J Korean

- Med Rehabi 2014;24(2):51-64.
22. Sim BY, Bak JW, Lee HJ, Jun J, Choi HJ, Kwon CJ, et al. Effects of natural eggshell membrane (NEM) on monosodium iodoacetate- induced arthritis in rats. J Nutr Health, 2015;48(4):310-8.
 23. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acut and chronic inflammation. Front Biosci, 1997; 2:12-26.
 24. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000;118(2):503-8.
 25. Kim EN, Roh SS, Jeong GS. Inhibitory effect of Sparassis crispa (Wulf.) ext ract on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis. Korean J Pharmacogn 2018;49(3):262-9.
 26. Ji MJ, Lim SC, Kim JS, Lee HJ, Lee YK. Effects of Curculiginis Rhizoma Pharmaco- Acupuncture at ST36 on Monosodium Iodoacetate (MIA)-induced Osteoarthritic Rats. J Acupunct Res 2015;32(1):53-66.
 27. Woo CH, Oh, MS. Effects of Bujasasim-tang ethanol extract on oxidative stress, inflammation and osteoarthritic rat model. J Korean Med Rehabi 2015;25(2):15-35.

Figure

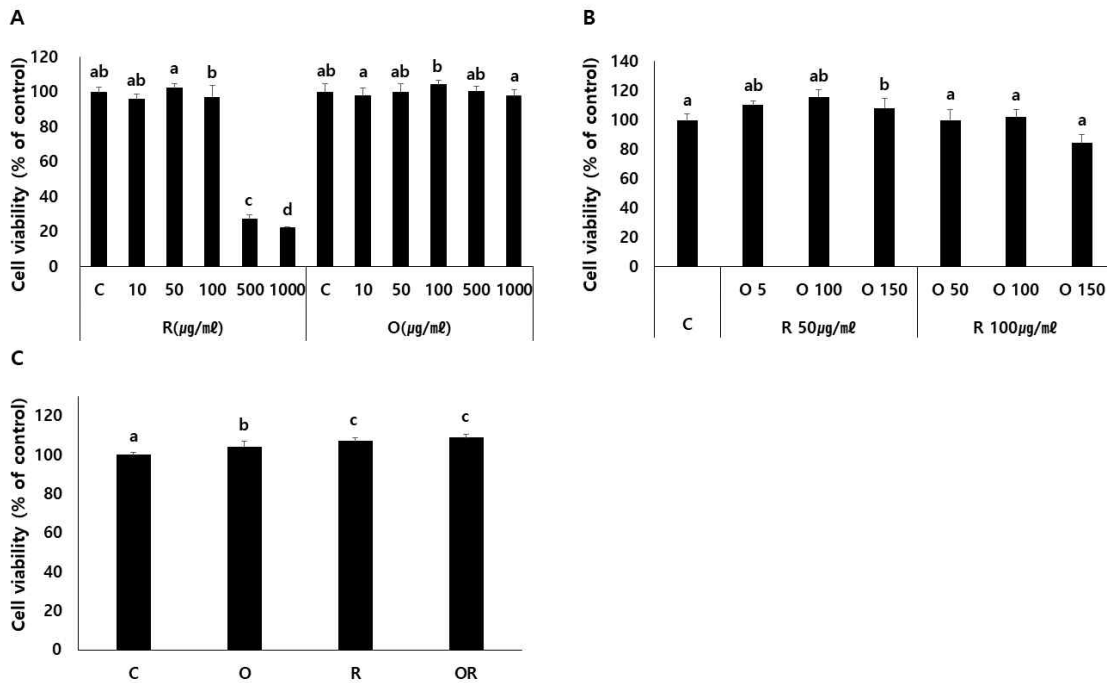


Figure 1. Effect of natural substances on cell viability in cultured RAW264.7 cells. (A) O (10–1000µg/ml) and R (10–1000µg/ml), (B) O (5, 100, 150µg/ml) and R (50, 100µg/ml) mixtures, (C) O (100µg/ml), R (50µg/ml) and OR mixture was treated into RAW 264.7 cells, cultured for 20 hours, and the cells were analyzed by the MTT method. Measured at 570nm using a microplate reader. Result are expressed as mean ± S.D. a–e: Different superscript letters mean significantly different between all the group. (p<0.05)

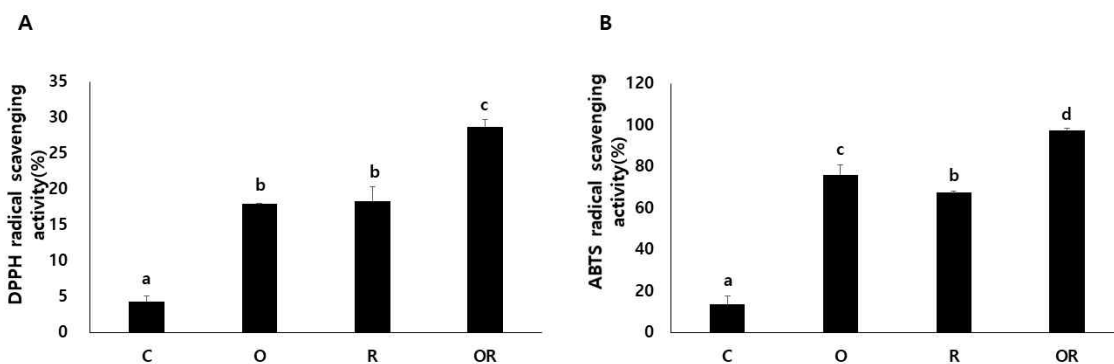


Figure 2. Effects of O, R and OR on radical scavenging activity. The radical scavenging activity of (A) DPPH, (B) ABTS is expressed as mean ± SD. a–e: Different superscript letters mean significantly different between all the group. (p<0.05)

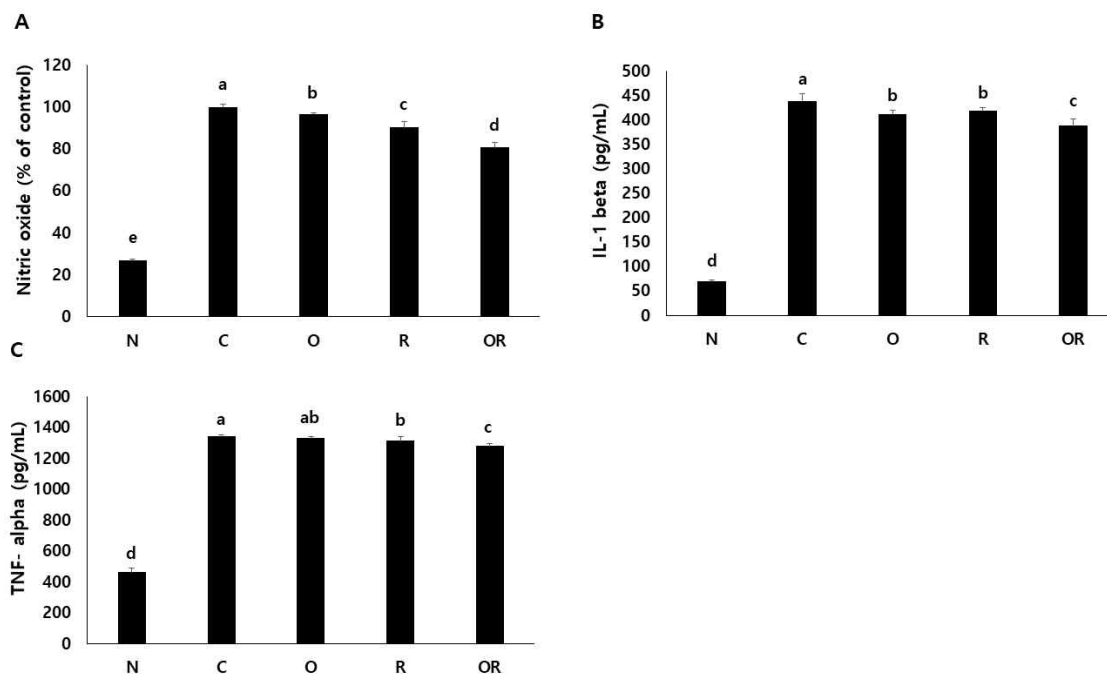


Figure 3. Effects of O, R and OR on (A) NO, (B) IL-1 β , (C) TNF- α production in cultured RAW 264.7 cells (A): RAW 264.7 cell (2×10^4 cells/well) was treated with O (100 μ g/ml), R (50 μ g/ml) and OR mixture and LPS (1 μ g/ml) for 24h. (B), (C): RAW 264.7 cell (8×10^5 cells/well) was treated with O (100 μ g/ml), R (50 μ g/ml) and OR mixture and LPS (1 μ g/ml) for 24h. The results were expressed as mean \pm S.D. a-e: Different superscript letters mean significantly different between all the group. ($p < 0.05$)

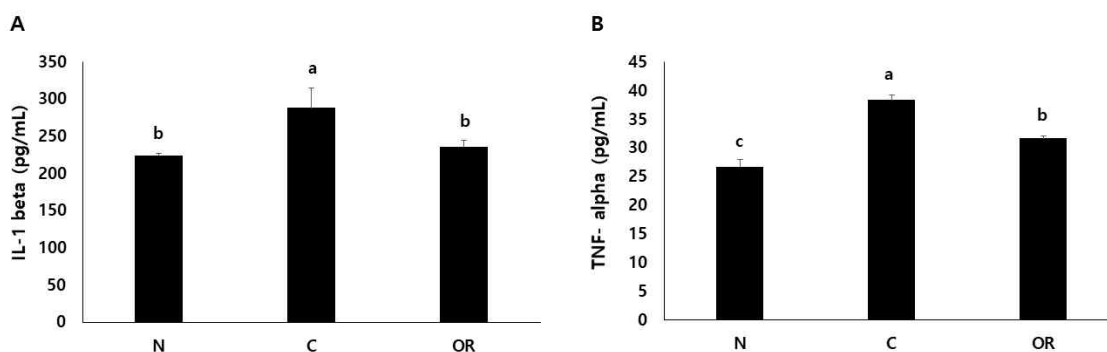


Figure 4. Effects of OR on (A) IL-1 β (B) TNF- α in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. N: Normal SD rat group, C: MIA-induced osteoarthritis rat group, OR: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with OR (O: 416.5 mg/kg, R: 208.25mg/kg). The results were expressed as mean \pm S.D. a-e: Different superscript letters mean significantly different between all the group. ($p < 0.05$)

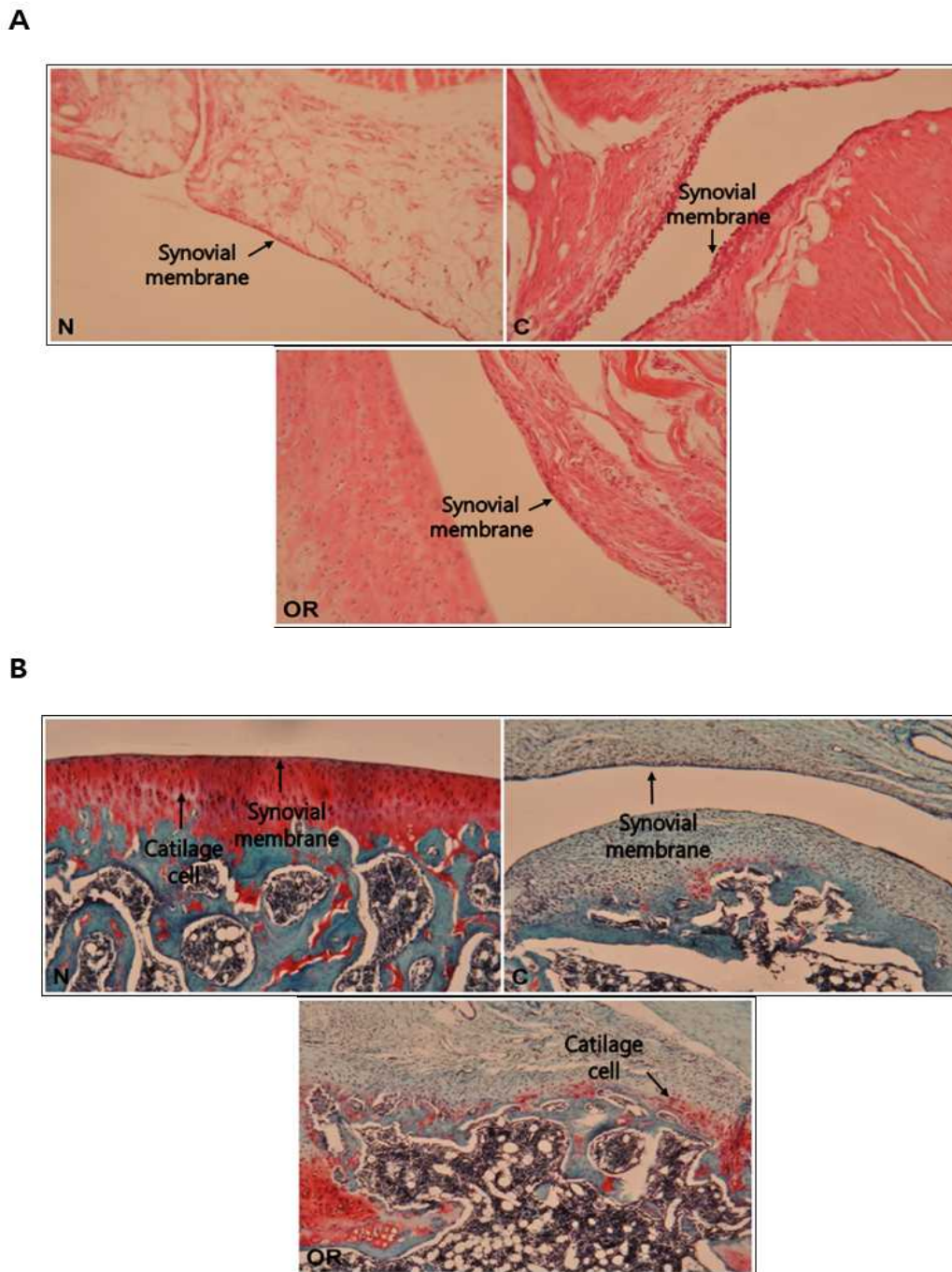


Figure 5. Effect of OR on joint pathology (A) Hematoxylin & Eosin(H&E), (B) Safranin-O in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rat.
N: Normal SD rat group,
C: MIA-induced osteoarthritis rat group,
OR: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with OR (O: 416.5 mg/kg, R: 208.25mg/kg).