

Monosodium iodoacetate로 유발된 골관절염 쥐에 乳香 성분 3-Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid의 연골보호 및 항염증 효과

김민주^{1#}, 신미래¹, 최학주¹, 박해진², 최황용³, 김화영³, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : DHU 바이오융복합시험센터, 3 : 주영엔에스(주)

3-Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid from *Boswellia serrata* Attenuates Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis by Chondroprotective and Anti-inflammatory Effects

Min Ju Kim^{1#}, Mi-Rae Shin¹, Hak Joo Choi¹, Hae-Jin Park², Hwang-Yong Choi³
Hwa-Young Kim³, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea

2 : DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea

3 : Ju Yeong NS Co. Ltd., 201, Songpa-daero, Songpa-gu, Seoul, 05854, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : 3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) is a major active compound in *Boswellia serrata*. We investigated the arthritic changes following AKBA administration in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats.

Methods : All rats were randomly divided into five groups: Normal, Control, INDO (indomethacin 2 mg/kg treated), AKBA30 (AKBA 30 mg/kg treated), and AKBA60 (AKBA 60 mg/kg treated); drugs were given 2 weeks before MIA injection. For all groups except the normal group, 50 μ L of sterile saline with MIA (80 mg/mL) was injected into the right knee joint 2 weeks after drug administration. The drug administration was continued for 4 weeks from 1 week after osteoarthritis induction. The histomorphological changes of knee joint cartilage were observed by H&E staining. Also, the levels of glycosaminoglycan (GAG), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), 5-lipoxygenase (5-LOX), 5-LOX-activating protein (FLAP), and leukotriene B₄ (LTB₄) in the knee joint were determined by the ELISA kits. The expressions of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), inflammatory cytokines, and matrix metalloproteinases (MMPs) in knee joint were detected by Western blot.

Results : Data show that levels of 5-LOX, FLAP, LTB₄, and COMP were downregulated significantly in the AKBA treated groups when compared to those in the Control group. On the other hand, GAG levels were significantly elevated. As a result of Western blot, the AKBA-treated groups significantly inhibited phosphorylation of MAPKs. In addition, significant downregulation of the expression of inflammatory cytokines and MMPs was found in the AKBA-treated groups.

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Min Ju Kim, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : mj8976@naver.com

· Received : 01 August 2022

· Revised : 30 August 2022

· Accepted : 25 September 2022

Conclusion : Our findings suggest that administration of AKBA could exert better chondroprotective and anti-inflammatory effects for MIA-induced osteoarthritis rats.

Key words : *Boswellia serrata*, 3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid, Monosodium iodoacetate, Osteoarthritis

I. 서 론

골관절염 (Osteoarthritis)은 전 세계적으로 고령화 사회에서 흔히 나타나는 만성적인 퇴행성 질환 중 하나이다^{1, 2)}. 관절을 이루고 있는 연골, 인대, 뼈 등에 손상을 입어 생기는 통증과 염증을 특징으로 가진다^{3, 4)}. 일반적으로 강직, 통증, 근육경련 또는 부종 등의 증상이 나타나며, 골관절염이 일어나는 원인으로서는 퇴행성 변화, 감염, 면역계 이상, 외상, 대사 장애 등이 있다⁵⁾. 한의학적으로 골관절염은 痺病證에 속하며 關節, 筋骨, 肢體 등에 腫脹, 麻木, 屈伸不利, 熱感 등과 같은 증상이 일어나는 질환으로 주로 痺證의 치료법을 사용하였다⁶⁾. 현재 골관절염의 치료방법으로는 연골 보호제, 아세트아미노펜 등의 스테로이드성 진통소염제, 나프록센, 이브프로펜 등의 비스테로이드성 진통소염제와 같은 약물들을 사용하는 약물치료법 있으나 이러한 약물들은 오랫동안 복용하면 위장, 간 및 신기능에 장애를 일으키거나 중독 등의 부작용들이 나타나게 된다고 알려져 있다⁷⁾. 그렇기에 골관절염 치료효과가 있으며 부작용이 적은 천연소재의 개발이 필요한 실정이다.

橄欖科 (Burseraceae)에 속한 乳香 (*Boswellia serrata*)은性は溫하며 독이 없고, 味는辛, 苦하다. 乳香은 肝, 心, 肝經에 주로 작용하고 助陽, 活血止痛, 舒筋, 消腫 등과 같은 효능이 지니고 있어 經前腹痛, 經閉, 久潰不斂, 產後瘀血刺痛 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 현재까지 진행된 연구들로는 항산화, 항염증 및 항균 등의 작용으로 피부염 개선효과 등이 있다^{9, 10)}. 주요 성분인 boswellic acid는 boswellia 종의 gum resin에 존재하는 terpenoids이다¹¹⁾. 약 12개의 서로 다른 terpenoids가 확인되었으며¹²⁾, 그 중에서 β -boswellic acid (BBA)와 Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA)는 여러 약리적 효과가 있다고 알려져 있다¹³⁾. AKBA는 염증 반응에 관여하는 류코트리엔 (leukotrienes)을 형성하는데 작용하는 5-lipoxygenase (5-LOX)의 활성을 억제시킴으로 염증성 사이토카인들의 생성을 억제하는 물질로 알려져 있으나 골관절염모델에서의 작용기전 및 효능을 확인하기 위한 기반 연구는 미비한 실정이다¹⁴⁾.

이러한 근거에 따라 본 연구에서는 monosodium iodoacetate (MIA)로 골관절염을 유발한 동물모델에 乳香의 성분인 AKBA를 투여할 경우 미치는 영향에 대하여 연구하였고, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 시험물질인 3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA)는 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Sichuan, China)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 골관절염 유발약물인 monosodium iodoacetate (MIA)와 양성대조 약물인 indomethacin는 Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 1차 항체인 p38 mitogen-activated protein kinases (p38)는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-ERK (p-ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), phospho-JNK (p-JNK), phospho-p38 (p-p38), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), MMP-13, β -actin, histone은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose membranes와 ECL Western Blotting Detection Reagents는 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다.

2. 실험동물

4주령의 Sprague-Dawley (SD)계 체중 140~160 g의 수컷 흰쥐를 DBL (Eumseong, Korea)에서 구매하여, 물과 고형 사료를 충분히 공급하며 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 명암주기 12시간, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 가 되도록 조절하였다. 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2021-099)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

3. 골관절염 유발 및 효능평가

1) 골관절염 유발 및 투여

실험동물의 오른쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA (80 mg/mL)를 당뇨주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 $50 \mu\text{L}$ 씩 투여한다. MIA 희석 시에는 0.9% saline을 사용하였다. 관절염의 유발을 확인하기 위해 MIA 투여 7일 후, 뒷발 체중부하를 기준으로 선별하였다.

실험군은 관절염을 유발하지 않은 정상군과 관절염을 유발하고 증류수를 투여한 대조군, 관절염을 유발하고 indomethacin을 2 mg/kg 투여한 양성대조군 (INDO), AKBA를 30 mg/kg (AKBA30), 60 mg/kg (AKBA60) 투여한 실험군 총 5그룹으로 각각 9마리씩 분류하여 실험에 사용하였다. 시험물질은 MIA로 골관절염을 유발하기 2주 전부터 매일 1회/1일 경구 투여 하였으며, 그 후 MIA로 골관절염을 유발하고 7일이 경과된 날부터 4주간 1회/1일 투여하였다.

2) 뒷다리 체중 부하 측정

Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., UK)를 이용하여 오른쪽, 왼쪽 뒷다리 부하 무게를 골관절염 유발 전, 유발 1주차, 3주차, 5주차 간격으로 측정하였다. 뒷다리 체중 부하 측정 결과는 골관절염이 유발된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량에 정상적인 왼쪽 뒷다리 부하량을 계산하여 체중 부하 비율을 계산하였다. 정상군의 체중 부하 비율에 각 군의 체중 부하 비율을 계산한 후 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 다음의 식을 이용하였다.

$$\text{체중 부하 비율} = \frac{\text{관절염 유발 뒷다리 체중 부하량}}{\text{정상 뒷다리 체중 부하량}} \times 100$$

$$\text{상대적 체중 부하} = \frac{\text{각 군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의 체중 부하 비율의 평균}} \times 100$$

3) 혈액학적 분석

실험 종료 후, 복대정맥에서 혈액을 채취하여 4,000 rpm, 4℃으로 10분간 원심 분리 후 상층액인 혈청을 분리하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 분리한 혈청 내 간손상 지표인 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT)를 ELISA Kit로 분석하였다. 사용된 GOT, GPT kit는 Asanpharm (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

4) 조직학적 분석

- Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

: 부검 후, 적출한 관절을 중성완충 포르말린에 고정한 후, 검체 제작에 적합한 강도가 될 때까지 탈회하였다. 탈회가 완료된 관절을, 조직표본 제작에 적합한 크기의 형태로 삭정을 한 후, 카세트에 넣어 13시간 조직처리를 실시하였다. 그 다음, 약 3μm 두께로 박절하여 발생된 절편을 슬라이드에 부착하여 건조 후 탈 파라핀, 함수 과정을 거쳐 증류수로 세척하였으며, H&E 염색을 실시하였다.

- 염증 및 연골관련 ELISA Kit 분석

: 관절 조직에 buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, protease inhibitor)와 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT,

0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1% glycerol, protease inhibitor)를 사용하여 세포질과 핵을 분리하였다. 분리된 세포질 내 5-lipoxygenase (5-LOX), 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), leukotriene B₄ (LTB₄), glycosaminoglycan (GAG), cartilage oligomeric matrix protein (COMP)을 ELISA Kit로 분석하였다. 사용된 5-LOX, FLAP, GAG, COMP kit는 Mybiosource (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, LTB₄ kit는 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

- Western blot

: 분리한 세포질과 핵 내의 단백질 발현을 측정하기 위해 일정량의 단백질을 10~12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 nitrocellulose membrane에 측정하고자하는 1차 항체 (PBS-T 1:1000 희석)를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T를 사용하여 세척하였다. 각각의 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T 1:3000 희석)로 2시간 상온에서 반응시킨 후 PBS-T로 세척하였다. 세척한 nitrocellulose membrane을 ECL 용액에 노출시킨 후 Sensi-Q2000 Chemidoc으로 단백질 발현을 확인하였으며, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램으로 발현량을 정량하여 실험군간 비교하였다 (Fold of Normal).

4. 통계분석

실험에 사용된 값들은 mean ± SD로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, IBM, Chicago, IL USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후검정을 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 체중 부하 결과

뒷다리 체중 부하를 측정한 결과, 유발 1주차에 정상군과 비교하여 MIA 골관절염 유발군들에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였으며, 대조군에 비하여 투여군들이 유의하지는 않으나 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 3주차부터는 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.001$), AKBA60군의 경우 5주차에는 양성대조군인 INDO군 만큼의 증가를 보였다 (Fig. 1).

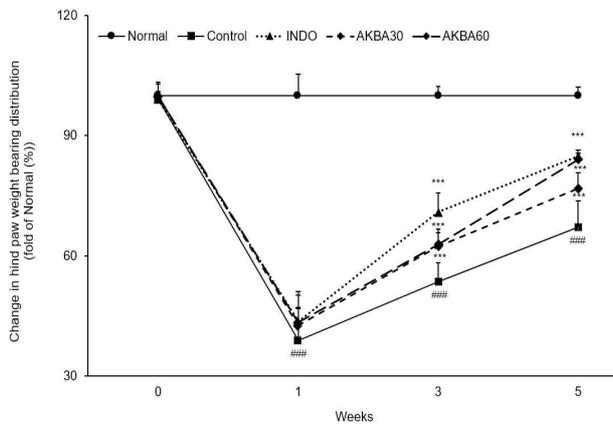


Fig. 1. Effects of AKBA on the hind paw weight bearing distribution in MIA-induced osteoarthritis rats. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

2. 혈청 내 GOT와 GPT 분석 결과

혈청 내 간손상 지표인 GOT와 GPT 수치를 측정된 결과, GOT의 경우 정상군에 비해 대조군에서 MIA로 인하여 26.99% 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 반면에 INDO군과 AKBA60군은 대조군에 비해 각각 13.27% ($p < 0.05$), 13.34% ($p < 0.05$) 유의하게 감소하였다 (Fig. 2A).

GPT의 경우 대조군에서 정상군보다 16.79% 유의하게 증가하였으며, 대조군에 비하여 투여군들에서 유의하지는 않으나 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

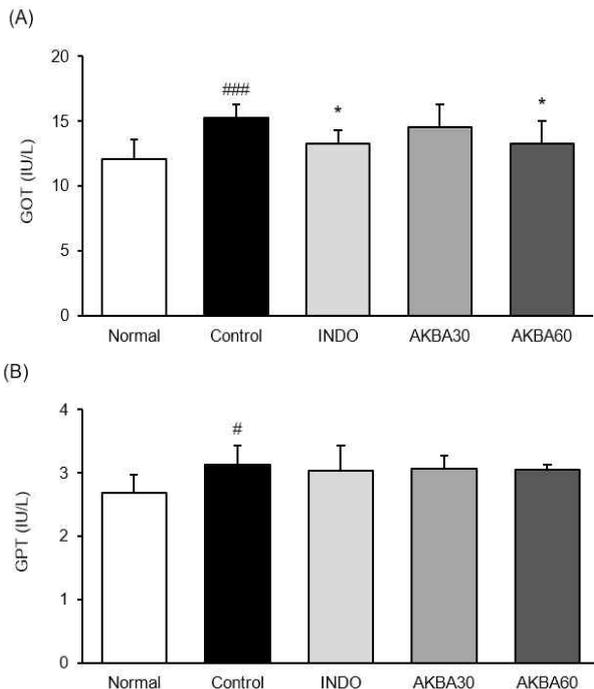


Fig. 2. Effects of AKBA on the levels of GOT and GPT in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Levels of (A) GOT and (B) GPT in serum measured by ELISA. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$ vs. Control group by LSD test.

3. 관절조직 내 GAG와 COMP 분석 결과

Proteoglycan의 분해산물인 GAG의 활성 분석 결과, 정상군 수치에 비해 대조군 수치가 0.68배로 MIA로 인해 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.001$), 투여군들인 INDO군, AKBA30군, AKBA60군은 각각 대조군 수치에 1.34배 ($p < 0.001$), 1.17배 ($p < 0.05$), 1.29배 ($p < 0.01$)로 대조군에 비해 GAG 수치가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 연골을 구성하는 Type 2 collagen의 분해산물인 COMP의 활성을 관절 조직 세포질에서 측정된 결과, 대조군의 수치가 정상군 수치의 1.77배로 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.001$). 한편 INDO군, AKBA30군, AKBA60군은 각각 대조군 수치에 0.71배 ($p < 0.001$), 0.82배 ($p < 0.01$), 0.76배 ($p < 0.001$)로 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다 (Fig. 3B).

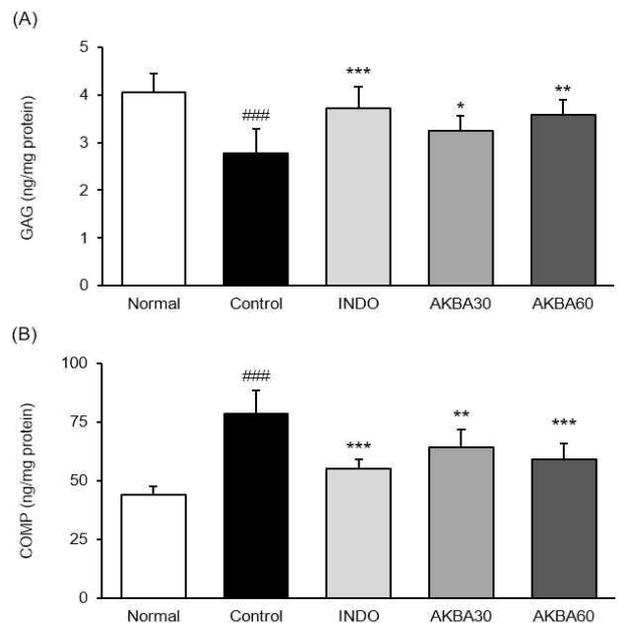


Fig. 3. Effects of AKBA on the levels of GAG and COMP in the knee joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Levels of (A) GAG and (B) COMP in knee joint measured by ELISA. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

4. 관절조직 내 5-LOX 경로 분석 결과

염증반응에 관여하는 물질인 류코트리엔 (leukotrienes)을 형성하는 주요 경로인 5-LOX, FLAP, LTB₄의 활성을 관절 조직 세포질에서 ELASA kit를 사용하여 측정하였다. 5-LOX 측정 결과, MIA에 의하여 대조군에서 수치가 정상군 수치에 1.31배로 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.001$), INDO군, AKBA30군, AKBA60군은 대조군 수치에 각각 0.80배 ($p < 0.001$), 0.82배 ($p < 0.01$), 0.79배 ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 5-LOX를 활성화시키는 FLAP를 측정된 결과, 대조군의 수치가 정상군 수치의 1.46배로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 대조군과 비교하여 INDO군, AKBA30군은 유의하지는 않으나 감소하는 경향이 나타났으며, AKBA60군의 경우, 대조군 수치의 0.88배로 유의

하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4B). 5-LOX의 대사산물 중 하나인 LTB_4 측정결과, 대조군의 수치가 정상군 수치의 4.21배로 유의하게 증가하였으며, INDO군, AKBA30군, AKBA60군은 대조군 수치에 각각 약 0.81배 ($p < 0.01$), 0.84배 ($p < 0.01$), 0.70배 ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4C).

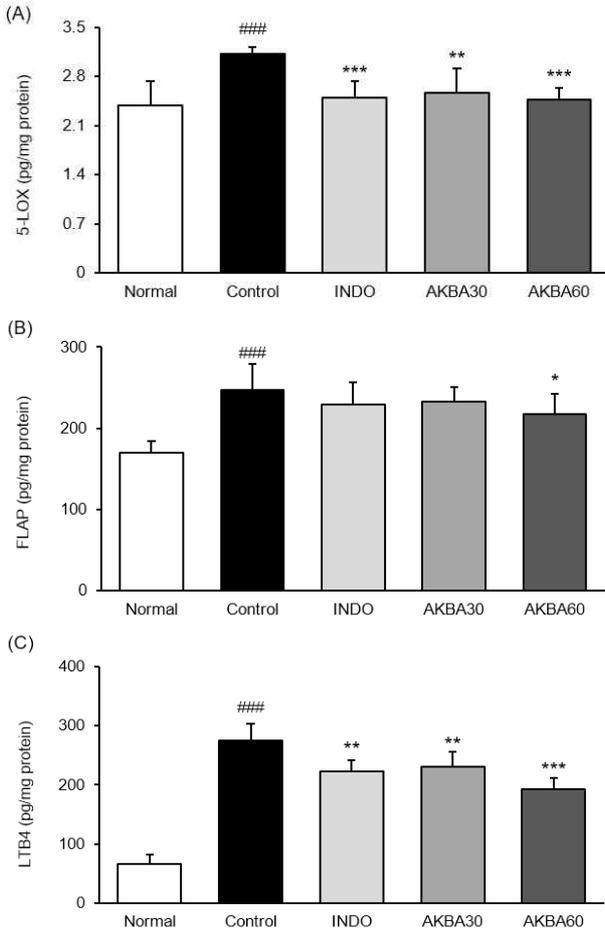


Fig. 4. Effects of AKBA on the levels of inflammation-related factors in the knee joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Levels of (A) 5-LOX, (B) FLAP, and (C) LTB_4 in knee joint measured by ELISA. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

5. Western blot 분석 결과

1) Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

여러 만성 염증성 질환에서 항염증을 조절하는데 중요한 역할을 하는 MAPKs 경로를 western blot으로 분석하였다. 그 결과, ERK, JNK, p38 모든 인자에서 정상군에 비하여 대조군에서 MIA에 의해 인산화가 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$). 증가된 ERK의 인산화를 INDO군, AKBA30군, AKBA60군이 각각 대조군 발현량의 0.72배 ($p < 0.001$), 0.86배 ($p < 0.05$), 0.83배 ($p < 0.01$)로 유의하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 JNK 인산화를 INDO군, AKBA30군, AKBA60군이 대조군 발현량의 0.75배 ($p < 0.01$), 0.85배 ($p < 0.05$), 0.85배 ($p < 0.05$)로 유의하게 억제시켰다.

그리고 p38 인산화를 INDO군과 AKBA60군에서 대조군 발현량의 0.77배 ($p < 0.001$), 0.84배 ($p < 0.01$)로 유의하게 억제시키는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

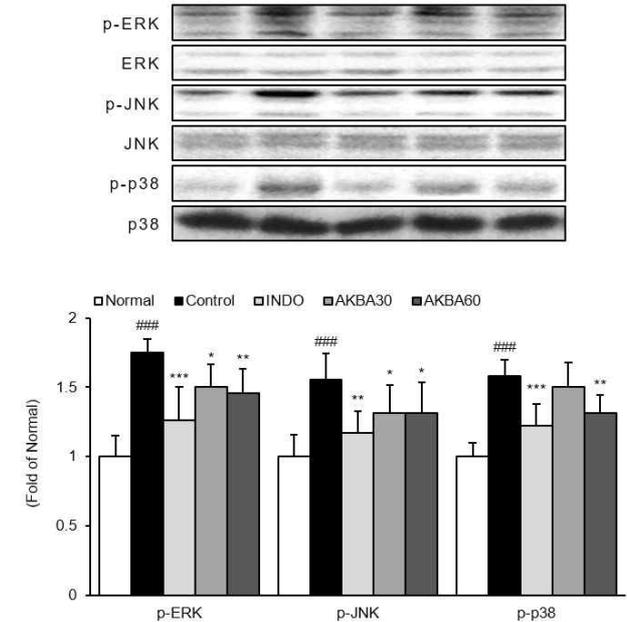


Fig. 5. Effects of AKBA on activities of MAPKs in the knee joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Expression of ERK, JNK, and p38 in knee joint measured by western blot. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

2) 염증성 사이토카인 분석

Western blot으로 염증성 사이토카인의 발현량을 분석한 결과, 모든 인자에서 MIA 골관절염 유발로 인하여 대조군에서 정상군보다 발현량이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.001$). 투여군들의 발현량은 TNF- α 의 경우, 대조군 발현량의 INDO군 0.73배 ($p < 0.001$), AKBA30군 0.88배 ($p < 0.01$), AKBA60군 0.78배 ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하였다. 그리고 IL-1 β 에서도 대조군 발현량의 INDO군 0.71배 ($p < 0.001$), AKBA30군 0.92배 ($p < 0.05$), AKBA60군 0.86배 ($p < 0.01$)로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. IL-6의 경우, 대조군 발현량의 INDO군 0.78배 ($p < 0.001$), AKBA30군 0.98배, AKBA60군 0.86배 ($p < 0.01$)로 INDO군과 AKBA60군에서 발현량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

3) Matrix metalloproteinases (MMPs)

연골을 구성하는 collagen 기질을 손상시켜 퇴행성 관절염을 더욱 악화시키는 것으로 알려진 MMPs를 western blot으로 분석한 결과, MMP-3의 경우 정상군에 비해 대조군의 발현량이 1.31배로 유의하게 증가하였으며, 투여군들은 이러한 대조군의 발현량의 INDO군 0.83배 ($p < 0.001$), AKBA30군 0.85배 ($p < 0.01$), AKBA60군 0.77배 ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하였다. 특히 AKBA60군의 경우 정상군 수준까지 감소

하는 것을 확인할 수 있었다. MMP-13 분석 결과, MIA로 인하여 대조군의 발현량이 정상군의 1.19배로 유의하게 증가하였으며, 투여군들은 대조군 발현량의 INDO군 0.86배 ($p < 0.001$), AKBA30군 0.97배, AKBA60군 0.91배 ($p < 0.05$)로 INDO군과 AKBA60군에서 발현량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

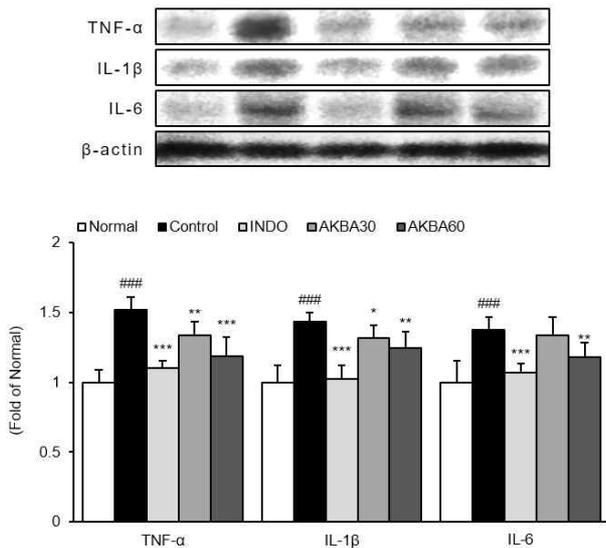


Fig. 6. Effects of AKBA on activities of inflammatory cytokines in the knee joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in knee joint measured by western blot. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

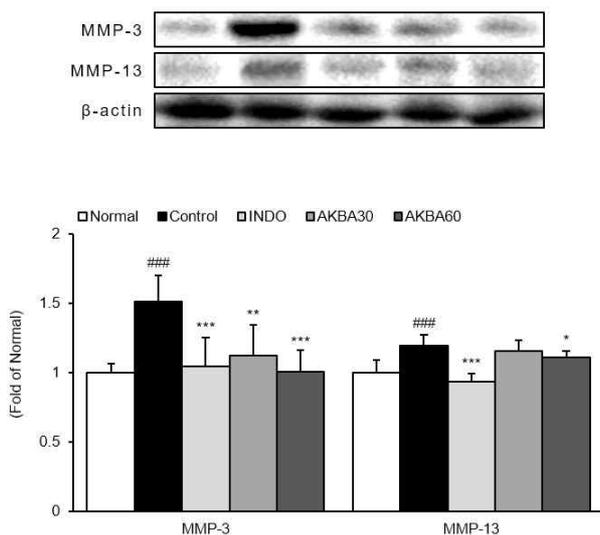


Fig. 7. Effects of AKBA on activities of MMPs in the knee joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Expression of MMP-3 and MMP-13 in knee joint measured by western blot. All data are expressed mean \pm SD ($n=9$ rats per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

6. 관절조직 H&E 염색 결과

관절조직의 손상된 연골의 회복 상태를 관찰하기 위한 H&E 염색 분석 결과, 정상군의 경우 연골과 활막 조직 등에 이상이 일어나지 않은 정상적인 상태이지만 대조군의 경우, MIA로 인하여 골관절염이 유발되어 연골 표면이 매끄럽지 못하며 활막 조직의 변성과 변형이 나타났다. 반면에 INDO군, AKBA60군의 경우 대조군과 비교해 연골 표면이 매끄러우며 활막 조직 등의 상태가 호전되어 MIA 유발에 의한 관절조직 손상이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

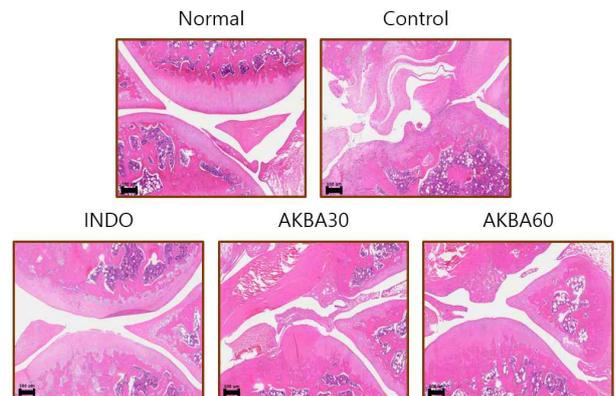


Fig. 8. Histopathological features of knee joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats. Representative photographs of knee joint tissues stained with hematoxylin&eosin (H&E, $\times 40$ magnification). Scale bars = 300 μ m

IV. 고찰

골관절염은 연골의 소실에 의해 연골하골과 활액막에 2차적인 변화를 일으키는 병증으로 고연령에서 높은 유병률이 나타난다¹⁵⁾. 실험에서 사용한 MIA는 실험동물에 주입되는 농도에 따라 관절의 퇴화와 기능장애를 여러 수준으로 유발할 수 있다고 알려져 있다¹⁶⁾. 이에 본 연구에서는 MIA로 골관절염이 유발된 동물모델에 乳香의 성분인 AKBA의 치료효과에 대하여 알아보았다.

실험군은 정상군, 대조군, indomethacin을 2 mg/kg 투여한 INDO군, AKBA를 30 mg/kg 투여한 AKBA30군, AKBA를 60 mg/kg 투여한 AKBA60군으로 총 5군으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험을 위하여 정상군을 제외한 나머지 군에 2주간 양성대조 약물인 indomethacin과 시험물질인 AKBA의 투여를 진행한 후, MIA로 골관절염을 유발하였다. 그리고 유발 1주일 후 4주간 다시 경구투여를 진행하였다. 4주간의 실험이 종료된 후, ELISA kit를 이용해 혈청 내 GOT, GPT와 관절 조직 내 5-LOX, FLAP, LTB₄, GAG, COMP를 측정하였다. 또한 western blot으로 관절조직 내 염증 및 collagen 기질 손상관련 단백질 발현을 분석하였다.

MIA로 한쪽 다리무릎에 골관절염이 유발된 동물모델의 경우 통증으로 인하여 유발된 다리에 힘을 주지 못하는 것이 특징이다. 이에 실험기간동안 실험동물들의 주간별 뒷다리 체중

부하를 측정된 결과, 유발 후 1주차부터 정상군 대비 대조군에서 유의하게 감소하였다. 투여군들의 경우 유발 전 2주간의 경구투여로 인하여 유발 후 1주치의 뒷다리 체중 부하가 대조군에 비하여 유의하지는 않으나 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 유발 3주차부터는 매주 대조군과 비교하여 모든 투여군들에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

간손상 지표인 GOT, GPT는 간, 심장 등의 조직에 있는 효소로 조직의 손상에 의하여 혈액 내로 분리되어 수치가 증가하게 된다¹⁷⁾. 혈청 내 GOT, GPT 수치를 측정된 결과, GPT 수치에는 큰 영향이 없었으나, GOT 수치의 경우 MIA 주입으로 인하여 증가된 수치들이 INDO군과 AKBA60군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 2).

관절연골을 구성하는 proteoglycan, GAG 등의 물질들이 줄어들게 되면 연골의 연화를 일으켜 관절의 퇴행성 변화를 야기시켜 골관절염이 진행되게 된다¹⁸⁾. COMP는 관절연골 내 Type 2 collagen의 분해산물로 골관절염이 진행되는 동안 함량이 증가하게 된다^{19, 20)}. 그렇기에 GAG와 COMP는 골관절염 관련 연구들에서 중요한 바이오마커로 사용되고 있다. 이에 실험동물의 관절조직 세포질 내에 GAG와 COMP 함량을 ELASA kit를 사용하여 분석하였다. GAG 함량 분석 결과, MIA가 무릎 관절연골을 손상시켜 대조군의 GAG 함량을 정상군 보다 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 반면에 INDO군과 AKBA 투여군들은 MIA로 인한 관절연골 손상을 억제하여 GAG 함량이 대조군 보다 유의하게 증가한 것을 확인하였다. COMP 함량 분석 결과, MIA로 인해 연골 내 collagen이 분해되어 대조군의 함량이 유의하게 증가하였으며, 이를 INDO군, AKBA30군, AKBA60군에서 유의하게 감소시킴으로써 실험동물의 골관절염을 개선시켰다 (Fig. 5).

염증과정에 관련된 arachidonic acid는 COXs, cytochrome P450, LOXs에 의해 대사되는데 그 중 5-LOX는 염증생성과 알레르기 반응에 관여하는 leuktrienes을 생성하는 경로의 핵심 효소이다²¹⁻²³⁾. 이러한 5-LOX를 활성화하는 단백질인 FLAP는 arachidonic acid를 5-LOX로 선택적으로 전달하여 leuktrienes 합성에 관여하는 역할을 한다고 알려져 있다²⁴⁾. 이렇게 활성화된 5-LOX는 여러 leuktrienes을 생성하는데 그 중 LTB₄는 염증반응에 관여하는 류코트리엔으로 여러 연구들에서 5-LOX의 활성을 억제할 경우 LTB₄의 생합성이 줄어든다는 보고들이 있다²⁵⁻²⁷⁾. 여러 연구들에서 AKBA가 염증반응에 관여하는 5-LOX 경로를 억제한다고 알려져 있다^{28, 29)}. 이에 관절조직 세포질 내 5-LOX 경로의 활성을 측정된 결과, 5-LOX, FLAP, LTB₄ 모두 정상군에 비하여 MIA 유발 대조군에서 수치들이 유의하게 증가하였으며, INDO군, AKBA30군, AKBA60군에서 감소하는 것으로 나타났다. 특히 AKBA60군의 경우, 5-LOX와 LTB₄의 활성을 대조군과 비교하여 유의하게 억제하여 양성대조군인 INDO군보다 5-LOX 경로의 활성 억제능이 우수한 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이러한 결과들로 인하여 기존의 연구들과 같이 AKBA가 5-LOX 경로 활성을 억제하여 관절 내 염증을 개선시킴을 확인할 수 있었다.

세포에 스트레스 자극을 주는 동안 MAPKs (ERK, JNK, p38) 경로는 5-LOX를 활성화한다고 알려져 있다³⁰⁾. Western blot으로 관절조직 내 MAPKs의 발현량을 측정된 결과, 대조

군이 MIA에 의하여 자극을 받아 phospho-MAPKs의 발현량이 증가하였으며, 대조군 대비 INDO군, AKBA30군, AKBA60군에서 유의하게 감소하는 경향이 나타났다 (Fig. 5).

염증성 사이토카인은 염증반응이 일어난 활막에서 과량으로 분비되어 연골의 구성성분인 proteoglycan의 합성을 억제하고 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. Western blot으로 관절조직에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현량을 측정된 결과, 투여군들에서 대조군에 비하여 유의하게 줄어드는 경향이 나타났다.

세포외기질분해효소인 MMPs는 나이가 많아질수록 과하게 발현하면 염증세포의 침윤 등이 일어나게 된다³²⁾. 골관절염이 일어나면 MMPs가 증가하여 주변 조직에 손상을 입히게 된다³³⁾. Western blot으로 MMP-3과 MMP-13의 발현량을 측정된 결과, 대조군에서 MIA로 인해 발현량이 증가했으며, 투여군들에서 대조군과 비교하여 감소하는 경향이 나타나는 것을 확인하였다. 특히, AKBA60군은 MMP-3 발현량을 정상군 수준까지 감소시켰다.

이러한 결과를 통해 AKBA는 MIA로 골관절염이 유발된 실험동물의 관절조직에서 MAPKs와 5-LOX 경로의 활성을 저해시켜 염증을 억제시키고 골관절염 관련 바이오마커인 GAG, COMP, MMPs에 작용하여 골관절염을 개선시키는 효과를 지니는 것으로 판단되어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 무릎 관절강 내 MIA 주입으로 골관절염이 유발된 동물모델에 乳香의 주요성분인 AKBA의 골관절염 개선효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험기간 동안 뒷다리 체중 부하를 측정된 결과, MIA로 인하여 줄어든 뒷다리 체중 부하를 AKBA가 농도 의존적으로 유의성 있게 개선하는 것을 확인하였다.
2. 실험 종료 후, 혈청 내 간손상 지표인 GOT, GPT를 측정된 결과, MIA로 증가된 수치를 AKBA 투여로 감소하는 것을 확인하였다.
3. 연골의 주성분인 GAG를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 수치가 감소하였으며, AKBA 투여시 농도의존적으로 유의하게 GAG 수치가 증가하였다. 또한 COMP의 수치를 유의하게 감소시켜 관절 내 연골 분해를 억제하였다.
4. 염증반응에 관여하는 5-LOX, FLAP, LTB₄ 수치를 관절조직 세포질에서 측정된 결과, MIA로 인하여 대조군에서 수치가 유의하게 증가하였으며, 이를 AKBA를 투여함으로써 억제하는 것을 확인하였다.
5. Western blot 분석결과, AKBA가 MAPKs의 발현을

감소시킴으로써 염증에 관여하는 NF κ B p65 경로를 유의하게 억제하였으며, 이로 인하여 연골 내 collagen 기질을 손상시키는 MMPs를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

6. H&E 염색 결과, 대조군은 MIA 주입으로 연골의 표면과 활막 조직의 손상이 관찰되었으며, AKBA 투여군들에서 손상된 연골 및 활막 조직이 회복된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 乳香의 주요성분인 AKBA는 무릎 관절강 내 MIA 주입으로 골관절염이 유발된 동물모델에서 류코트리엔을 형성하는 5-LOX 경로의 활성을 억제시킴으로써 염증관련 단백질과 collagen 기질 손상 관련 단백질의 발현을 감소시켜 골관절염을 개선시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 성과물은 2022년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2018R1A5A2025272)과 주영엔에스(주)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Min GY, Park JM, Joo IH, Kim DH. Inhibition effect of Caragana sinica root extracts on Osteoarthritis through MAPKs, NF- κ B signaling pathway. *Int J Med Sci*. 2021;18(4):861-872.
2. Lan H, Hong W, Qian D, Peng F, Li H, Liang C, Du M, Gu J, Mai J, Bai B, Peng G. Quercetin modulates the gut microbiota as well as the metabolome in a rat model of osteoarthritis. *Bioengineered*. 2021;12(1):6240-6250.
3. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(10):580-592.
4. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(1):20-26.
5. Kim MJ, Lee JA, Shin MR, Park HJ, Roh SS. Improvement Effect of Corni Fructus 30% Ethanol Extract by MIA-Induced Osteoarthritis Animal Model. *Kor. J. Herbol*. 2020;35(1):35-44.
6. Pakr WT, Jeong SH, Seo IB, Kim SJ. GCP Treatment on the Expression of NOS, C-fos, Serotonin and Substance-P in central nerve system of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic Pain Model. *J Kor Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(6):1483-1490.
7. Kim JS, Lee AY, Moon BC, Kim HS, Kim WJ, Kim C, Choi GY, Kim SH, Chun JM. Effects of aqueous extract from *Taxillus chinensis* on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Kor. J. Herbol*. 2018;33(5):81-88.
8. Lee SI, Kwon KB, Han JH, Ryu DG. Effects of Olibanum Extracts on Vascular Cell Adhesion Molecules Expression. *Korean J. Oriental Physiology & Patholog*. 2011;25(3):445-450.
9. Cho SA, Ryu EM. Effect of *Boswellia* on the Expression of Hair Cycle-related Genes in Skin of DNCB-induced Atopic Dermatitis Mice. *J Invest Cosmetol*. 2021;17(1):25-30
10. Nam DE, Kim OK, Shim TJ, Kim JH, Lee JM. Effect of *Boswellia serrata* Extracts on Degenerative Osteoarthritis in vitro and in vivo Models. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014;43(5):631-640.
11. Siddiqui MZ. *Boswellia serrata*, a potential anti-inflammatory agent: an overview. *Indian J Pharm Sci*. 2011;73(3):255-261.
12. Buchelle B, Simmet T. Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;795(2):355-362.
13. Efferth T, Oesch F. Anti-inflammatory and anti-cancer activities of frankincense: Targets, treatments and toxicities. *Semin Cancer Biol*. 2022;80:39-57.
14. Schweizer S, von Brocke AF, Boden SE, Bayer E, Ammon HP, Safayhi H. Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues. *J Nat Prod*. 2000;63(8):1058-1061.
15. Kim HJ, Shin EC, Yoo NJ, Park JH, Kim SK, Kang ES, Jahng JS. Apoptosis of Chondrocytes and Its Regulation in Pathogenesis of Osteoarthritis. *J Korean Rheumatic Diseases*. 2001;8(2):104-117.
16. Kim EN, Roh SS, Jeong GS. Inhibitory Effect of *Sparassis crispa* (Wulf.) Extract on Monosodium Iodoacetate Induced Osteoarthritis. *J Korean Pharmacogn*. 2018;49(3):262-269.
17. de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol*. 2011;39(6):949-957.
18. Kwon JH, Han MS, Lee BM, Lee YM. Effect of *Angelica gigas* extract powder on progress of

- osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rat. *ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 2015;28(1):72-77.
19. Saberi Hosnijeh F, Siebuhr AS, Uitterlinden AG, Oei EH, Hofman A, Karsdal MA, Bierma-Zeinstra SM, Bay-Jensen AC, van Meurs JB. Association between biomarkers of tissue inflammation and progression of osteoarthritis: Evidence from the Rotterdam study cohort. *Arthritis Res Ther*, 2016;18:81-90.
 20. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002;10(9):707-713.
 21. Sailer ER, Schweizer S, Boden SE, Ammon HP, Safayhi H. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem*, 1998;256(2):364-368.
 22. Ghosh J, Myers CE. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997;235(2):418-423.
 23. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, Hu J, Fleming L, Wang DW. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 2021;6(1):94-124.
 24. Evans JF, Ferguson AD, Mosley RT, Hutchinson JH. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2008;29(2):72-78.
 25. Min KR, Shin JM, Chang YS, Kim YS. The Activity of 5-Lipoxygenase and the Inhibitor of Leukotriene B₄ Biosynthesis. *Yakhak Hoeji*, 1989;33(6):319-323.
 26. Enderes J, Mallesh S, Stein K, Wagner M, Lysson M, Schneiker B, Kalff JC, Wehner S. Treatment with the 5-Lipoxygenase Antagonist Zileuton Protects Mice from Postoperative Ileus. *Eur Surg Res*, 2022;2022:1792894.
 27. Lopes DEM, Jabr CL, Dejana NN, Saraiva AC, de Aquino SG, Medeiros AI, Rossa Junior C. Inhibition of 5-lipoxygenase attenuates inflammation and bone resorption in lipopolysaccharide-induced periodontal disease. *J Periodontol*, 2018;89(2):235-345.
 28. Ahmed MAE, Ahmed AAE, El Morsy EM. Acetyl-11-keto-β-boswellic acid prevents testicular torsion/detorsion injury in rats by modulating 5-LOX/LTB₄ and p38-MAPK/JNK/Bax/Caspase-3 pathways. *Life Sci*, 2020;260:118472.
 29. Gilbert NC, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, Börner F, Garscha U, Neau DB, Werz O, Newcomer ME. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol*, 2020;16(7):783-790.
 30. Werz O, Bürkert E, Samuelsson B, Rådmark O, Steinhilber D. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 2002;99(3):1044-1052.
 31. Kim MJ, Park HJ, Kim KJ, Lee JA, Shin MR, Roh SS. Protective Effect of Dioscoreae Rhizoma Extracts in MIA-induced Rat. *Kor. J. Herbol*, 2019;34(4):27-35.
 32. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implication. *J Clin Oncol*, 2000;18:1135-1149.
 33. Lee HJ, Park JO, Oh MS. Anti-inflammation and antioxidation effects of gamkiyejakjimo-tang herbal acupuncture on pathologic factor and MIA-induced osteoarthritis rat. *J Korean Med Rehab*, 2015;25(4):1-20.