

通草와 木通 추출물이 monosodium iodoacetate(MIA)로 유발된 골관절염 동물 모델에 미치는 효과

이상남^{1#}, 서부일^{2*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 기공학교실, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Effects of *Tetrapanax papyrifer* stem and *Akebiae quinata* stem on a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis

Sang Nam Lee^{1#}, Bu-Il Seo^{2*}

1 : Dept. of Qigong, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
2 : Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was planned to evaluate the therapeutic effectiveness and possible underlying mechanism of TPE (*Tetrapanax papyrifer* stem(inner part of the stem Extract) and AQE (*Akebiae quinata* stem Extract) on osteoarthritis.

Methods : Osteoarthritis models were induced through intra-articular injection of MIA (monosodium iodoacetate) 50 μ L with 80 mg/ml in rats. Excluding the normal group, Osteoarthritis-induced rats were divided into 4 groups (Control, INDO, TPE, AQE). The drug concentrations were indomethacin 5 mg/kg, TPE 200 mg/kg, and AQE 200 mg/kg, and were orally administered once a day for a couple of weeks. After drug supplementation, the effects of TPE and AQE were measured with serum diagnosis, western blotting, and histopathological staining.

Results : It was found that the DPPH and ABTS free radical erasure ability of AQE was better than that of TPE. AQE administration improved rear limb overload and it led to relieving pain. Both PTE and AQE significantly reduced the expression of inflammatory mediators COX-2, iNOS, and inflammatory cytokine IL-1 β and IL-6 by inhibiting the phosphorylation of I κ B α and deactivating the pathway of NF- κ Bp65. On the other hand, TNF- α was significantly reduced only by administration of AQE. In addition, histopathological analysis showed that the administration of AQE compared to PTE suppressed cartilage degeneration and effectively suppressed damage to proteoglycan, a component of ECM.

Conclusion : Reviewing these experimental results, TPE and AQE possessed the effect of delaying the progress of osteoarthritis and protecting cartilage. In addition, the results of this study show that AQE has a better cartilage protection effect than TPE.

Key words : MIA, osteoarthritis, *Tetrapanax papyrifer* stem, *Akebiae quinata* stem

*Corresponding author : Bu-il Seo, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.
· Tel : +82-53-819-1876 · E-mail : seojangsan@naver.com

#First author : Sang Nam Lee, Department of Qigong, College of Korean Medicine, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1829

· E-mail : lsn1974@dhu.ac.kr

· Received : 12 October 2023

· Revised : 05 November 2023

· Accepted : 25 November 2023

I. 서론

골관절염(osteoarthritis)은 세계적으로 빈발하는 만성 염증성 퇴행성 질환으로¹⁾, 관절을 보호하는 연골의 퇴행 변화 혹은 손상으로 인하여 관절을 형성하고 있는 뼈, 인대 등에 손상이 발생하여 통증이나 염증 증상이 생기는 질환이다^{2,3,4)}. 최근 고령화와 비만 인구의 증가로, 우리나라에서도 골관절염에 빠르게 증가하고 있다⁵⁾.

골관절염의 발생 원인으로는 퇴행성 변화, 외상, 감염, 대사 장애, 면역계 이상 등이 있으며, 나타나는 주요 증상으로는 근육의 강직이나 경련, 관절 주위의 통증이나 부종 등의 증상이 나타난다^{2,3,4)}.

한의학에서 관절염은 관절의 痺證에 해당하는 질환 중 하나로 이해했으며⁶⁾, 治法으로는 強筋骨, 祛風濕, 活血祛瘀를 사용한다⁴⁾.

Monosodium iodoacetate (MIA)를 투여하면 농도의 다양한 수준에 따라 관절의 기능장애와 퇴행을 유발할 수 있고, 유발된 관절의 퇴행 정도에 따라서 통증 수준을 평가할 수 있는 장점이 있다^{7,8)}.

通草는 두릅나무과(Araliaceae) 관목인 통탈목(通脫木) *Tetrapanax papyriferus* (Hook.) K. Koch.의 줄기의 속심을 건조한 것으로^{9,10)}, 淸熱利水滲濕, 通氣下乳하는 효능이 있다^{9,10)}. 木通은 으름덩굴과(Lardizabalaceae) 낙엽 덩굴성 관목인 으름(木通) *Akebia quinata* Decne., 三葉木通 *Akebia trifolia* (Thunb.) Koidz.[=*Clematis trifolia* Thunb.], 白木通 *Akebia trifolia* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels.) Rehd.의 목질경(木質莖)으로^{9,10)}, 降火利尿消腫, 通經下乳, 淸熱解毒, 活血通痺, 通利血脈하는 효능이 있다^{9,10)}.

通草에는 항산화 활성¹¹⁾, 미백활성이 있고⁹⁾, 모유분비 촉진하는 효과¹²⁾가 있는 것으로 밝혀졌으며, 木通에는 모유분비 촉진¹²⁾, 진통효과¹³⁾, 신부전 및 신기능 장애 개선효과^{14,15)}, 알코올로 인한 간의 지방병증과 비장 및 가슴샘의 위축성 변화 개선 효과¹⁶⁾, 혈압강하 작용이 밝혀졌지만¹⁷⁾, 利尿通淋藥으로 주로 활용되는 通草와 木通의 골관절염에 대한 효과는 실험적 연구를 통하여 밝혀진 바가 없으며, 또한 관절염의 효과에 대한 두 가지 약재의 감별 결과도 밝혀진 바가 없다. 이에 MIA로 골관절염을 유발한 rat 모델에서 通草와 木通의 물 추출물을 투여하여 관절의 변화에 대한 항산화, 항염증 효과를 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에서 사용한 monosodium iodoacetate(MIA), dithiothreitol(DTT), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulphonic acid)(ABTS), phenylmethylsulfonyl fluoride, potassium phosphate dibasic, gallic acid, sodium carbonate, naringin, sodium hydroxide, Indomethacin, potassium phosphate monobasic 시약들을 Sigma Aldrich Co. Ltd.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 마취제 Zoletil을 Vibrac (Carros, France)에서 구입하였고, rompun (Bayer Korea Ltd, 서울, 한국)을 혼합하여 사용하였다. Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 1차 항체인 nuclear factor- κ Bp65(NF- κ Bp65), inhibitor of κ B α (I κ B α), phosphorylated inhibitor of κ B α (p-I κ B α), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10(IL-10), inducible nitric oxide synthase(iNOS), β -actin, histone, cyclooxygenase 2(COX-2), tumor necrosis factor(TNF) α , interleukin-1 beta(IL-1 β), interleukin-6(IL-6), matrix metalloproteinase-1(MMP-1), matrix metalloproteinase-2(MMP-2), matrix metalloproteinase-3(MMP-3), matrix metalloproteinase-9(MMP-9), matrix metalloproteinase-13(MMP-13), p47^{phox}, p22^{phox}, Catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase-1/2(GPx-1/2)를 구입하였으며, 2차 항체는 Gene Tex Inc.(Calif, USA)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 그리고 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입한 ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)와 protease inhibitor를 사용했고, Amersham GE Healthcare(Buckinghamshire, UK)에서 구입한 ECL Western Blotting Detection Reagents와 nitrocellulose membrane를 사용하였다. Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 BCA protein assay kit를 구입한 후 단백질 정량 실험에 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 대한바이오링크(음성, 한국)에서 제공 받은 7 주령(200~250 g) 웅성 Sprague-Dawley rat를 골관절염 유발에 사용하였다. 실험 당일까지 물과 고형 사료(Zeigler Bros, Inc., USA)를 자유롭게 식이 공급하였다. 온도(22±2℃), 습도(55±5%) 및 명암주기(12시간)가 잘 유지되는 사육 환경에서 일주일 동안 적응시킨 후에 본 실험에 투입되었다. 또한, 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)에서 승인(승인번호 : DHU2020-066)을 받아 동물 실험을 실시하였다.

3) 약재

본 실험에서 사용된 通草와 木通은 옹기한약국(대구, 한국)에서 구입하여 열탕 추출기에 각각 通草와 木通 200 g과 증류수 2 L를 넣고 2시간 동안 가열 추출해서 얻은 추출액을 여과한 후 감압 농축기를 사용해(설정온도 50℃) 감압 농축하였고, 동결건조기를 활용하여 완전 건조한 通草와 木通 파우더를 얻었다. 각각 수율은 9.5%와 11%이고 냉동보관(-80℃)하여 실험에 사용하였다.

4) 실험기기

본 실험에서 동결건조기(FD5508, 일신, 한국), 열탕추출기(DWT-1800T, Daewoong Bio, 충북, 한국), 전자체중계(CAS, 경기, 한국), rotary vacuum evaporator(Buchi B-480, Switzerland), vortex mixer, incapacitance tester(Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., UK), Sensi-Q2000 Chemidoc(Lugen Sci Co., Ltd., 경기, 한국), 냉장고속원심분리기(Mega17R, 한일과학, 서울, 한국), tissue grinder(Bio Spec Product, Bartlesville, USA), ATTO Densitograph Software(ATTO Corporation, Tokyo, Japan), Microplate reader(Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)를 사용하였다.

2. 방법

1) Total polyphenol 및 total flavonoid 측정

Total polyphenol은 Folin-Denis 방법¹⁸⁾으로 함량을 측정하였다. 10 µL의 通草와 木通 시료, 증류수 790 µL, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 µL를 혼합하여 실온에서 1분 동안 반응시킨 후 150 µL의 20% sodium carbonate를 넣어 주었다. 실온의 환경에서 반응을 2시간 시킨 다음, 765 nm에서 Microplate reader로 흡광도를 측정하고, 표준물질인 gallic acid로 표준 검량선을 구하고 total polyphenol의 함량을 계산하였다.

Lister 등의 방법¹⁹⁾에 의해 total flavonoid의 함량을 측정하였다. Diethylene glycol 1 mL, 100 µL의 通草와 木通의 각각 시료, 1 N NaOH 10 µL를 혼합하여 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 다음, Microplate reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 naringin으로 표준 검량선을 구하여 total flavonoid 함량을 계산하였다.

2) DPPH free radical 소거능 분석

通草와 木通 추출물의 항산화능을 분석하기 위해서 DPPH free radical 소거법을 사용하였다²⁰⁾. 60 µM DPPH 용액(100 µL)과 通草와 木通 추출물을 농도별로 희석한 용액(100 µL)을 혼합한 후 실온의 암실에 30분 동안 반응시킨 후에 Microplate reader로 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 본 실험에서 L-ascorbic acid는 실험에 양성대조군으로 사용하였으며, 전자공여능은 아래의 식으로 계산하여 흡광도 값을 구하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample} : Absorbance of sample

OD_{control} : Absorbance without sample

3) ABTS radical 소거능 분석

ABTS radical 소거법²¹⁾을 활용하여 通草와 木通 추출물의 항산화능 효능을 평가하였다. 7 mM ABTS 시약과 2.4 mM

potassium persulfate를 혼합하여 암소 및 실온의 환경에서 약 16시간 이상을 방치한 다음, ABTS⁺을 형성시켜 흡광도 415 nm에서 0.70±0.02 측정값이 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS 용액(95 µL)에 通草와 木通 추출물 5 µL를 추가하여 15분 동안 방치하고 Microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서는 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 실험에 사용하였고, 흡광도 값을 아래의 식으로 계산하여 산출하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample} : Absorbance of sample

OD_{control} : Absorbance without sample

4) MIA에 의한 골관절염 유발

Zoletil mixture 0.75 mg/kg를 복강으로 투여하여 rat를 마취시켜 오른쪽 무릎 주변을 깨끗하게 털을 없앤 후에, 관절강 내에 50 µL(80 mg/mL)의 MIA를 insulin 주사기(BD 31G, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 주입하여 골관절염을 유발하였다. 실험에는 MIA를 투여한 일주일 후에 골관절염이 유발된 쥐만 선별하여 사용하였다.

5) 약물투여와 군 분리

실험군은 무작위로 5군으로 각 군마다 8마리씩 분리하였다. 정상군(Normal), MIA로 골관절염을 유발한 후에 증류수를 투여한 대조군(Control)과 MIA로 골관절염을 유발한 후에 Indomethacin 5 mg/kg를 경구 투여한 군(INDO) 및 MIA로 골관절염을 유발한 후에 약물 通草 200 mg/kg를 경구 투여한 군(TPE), MIA로 골관절염을 유발한 후에 약물 木通 200 mg/kg를 경구 투여한 군(AQE) 등 모두 5군으로 분리하였으며, 각 군마다 마릿수는 8마리였다. Indomethacin과 通草와 木通 추출물은 2주 동안 일정한 시간에 경구 투여하였는데, 증류수에 매일 녹인 후 혼합하여 사용하였다.

6) 체중, 식이섭취량 및 식이효율 측정

2일에 1번씩 동일한 시간과 조건에서 전자체중계를 이용하여 rat의 체중을 측정하였고, 실험 종료일에 체중을 잰 뒤 실험 개시 전 체중을 제한 후 체중의 증가량(body weight gain)을 계산하였다. 또한, 식이섭취량은 2일 동안 제공된 식이에서 섭취하고 남은 식이량을 제한 후 각 실험군의 하루 식이섭취량을 계산하였으며, 실험군의 식이효율(FER; food efficiency ratio %)은 각 쥐의 체중 증가량을 동일한 사육 기간의 식이섭취량으로 나누어 산출하였다.

(1) 체중 (body weight)

① 각 실험군의 체중 변화

2일 간격으로 오전마다 동일한 시간에 1번씩 체중을 측정 한 후 기록

② 체중 증가량

Final body weight (g) - Initial body weight (g)

(2) 식이효율 (food efficiency ratio, FER)

식이효율 (%) = 총 체중 증가량 / 총 식이 섭취량 × 100

7) 뒷다리 체중 부하 측정

뒷다리 체중 부하 측정일은 通草와 木通 추출물을 경구 투여 시작 1주일과 2주일 째 되는 날 진행하였다. Rat가 자연스럽게 서 있을 때 incapitance tester를 이용하여 양쪽 발의 각각의 무게를 측정하였다. Rat의 오른쪽 무릎에 골관절염이 유발 되면 MIA를 주입하지 않은 왼쪽 발에 의지하여 tester의 holder 안에 서 있게 된다. 이때 오른쪽, 왼쪽 각 발의 무게 (g)를 측정하여 산출하였다. 실험 결과는 골관절염을 유발한 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량과 왼쪽 뒷다리 (정상)의 체중 부하량을 계산한 뒤 체중 부하 비율을 평가하였다.

f 체중 부하 비율

$$= \left(\frac{\text{오른쪽 뒷다리 무게}}{\text{왼쪽 뒷다리 무게} + \text{오른쪽 뒷다리 무게}} \right) \times 100$$

8) 간 기능 지표 분석

혈중 Glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT)와 Glutamate-pyruvate transferase(GPT)는 Asan Pharm, Co. Ltd.(Seoul, Korea)의 Kit를 이용하여 측정하였다.

9) 단백질 발현량 분석

단백질 발현량 분석을 위한 관절조직의 세포질을 얻기 위해, 1.5 M sucrose, 7.5 pH의 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 7.4 pH의 100 mM Tris-HCl, 15 mM CaCl₂와 protease inhibitor, 0.1 M DTT를 추가한 buffer A를 넣은 뒤 tissue grinder로 분쇄하여 NP-40(10%)를 넣어주었다. Ice 위에서 20분 동안 방치 후 원심 분리기를 12,000 rpm으로 2분간 실시하여 상층액(세포질 함유)을 분리하였다. 핵을 획득하기 위하여 NP-40(10%)를 추가한 buffer A로 2회 잘 씻어내고, 100 μL의 buffer C(10% glycerol, 1 mM DTT, 0.3 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 50 mM HEPES)를 추가하여 다시 부유시킨 뒤, 10분 간격으로 vortexing을 총 3회 실시하였다. 4℃에서 10분 간격, 12,000 rpm으로 원심 분리기를 통해 상층액(핵 함유)을 얻은 후 -80℃에서 세포질과 핵을 냉동 보관하였다. 관절조직 세포질의 β-actin, COX-2, iNOS, p22^{phox}, p47^{phox}, p-IκBα, IκBα, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, SOD, Catalase, GPx-1/2 및 핵 속에 있는 Histone, NF-κBp65 등 각 단백질의 발현량을 확인하기 위해서 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 만든 후에, 10 μg의 단백질을 전기영동한 후 SDS-polyacrylamide gel에서 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 전기영동 되어진 membrane에 분석하고자하는 1차 항체를 처리한 후, 4℃에서 overnight 하였으며, PBS-T로

8분 간격으로 6회 세척하고, 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1 : 5000 희석)를 사용하여 상온에서 2시간 30분 반응시킨 뒤, PBS-T로 8분 간격으로 5회 세척하였다. 그리고 ECL solution(GE Healthcare, UK)에 membrane을 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시킨 후 해당 단백질의 발현을 확인한 뒤, band의 정량을 위해 ATTO Densitograph Software 프로그램을 활용하였으며, 각각의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나눈 후에 상대적인 비로 나타내었다.

10) 조직병리 분석

부검 후에 우측 관절 부위를 절단한 뒤 10% 포르말린 용액에 넣어 관절을 탈회시키고 radiographic technique을 적용한 후 탈회 유무를 평가하여 파라핀 왁스에 관절을 넣고 고정시킨 다음 coronal section을 진행하였다. 그 다음 파라핀으로 고정된 조직을 7 μM로 자른 후, H/E와 Safranin-O 염색을 시행하였으며, 현미경을 이용하여 관절 조직의 상태를 관찰하였다.

11) 통계처리

실험의 결과 값은 *in vitro*에서 mean ± SEM, *in vivo*에서 mean ± SD로 나타냈고, SPSS program for windows version 25(SPSS Inc., Chicago, IL USA)로 one-way analysis of variance(ANOVA) 검정을 실시하였으며, 각 자료의 통계적 유의성을 Least Significant Difference(LSD) method로 검증하였고, 정상군과 대조군, 대조군과 약물 투여군 사이에 *p*-value < 0.05 일 경우에 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결 과

1. Total polyphenol과 total flavonoid 측정

실험에 사용된 通草와 木通의 total polyphenol 및 total flavonoid를 분석한 결과, 각각 total polyphenol의 경우 42.33 ± 0.28 mg/g, 53.71 ± 0.27 mg/g으로 나타났으며, total flavonoid의 경우 23.54 ± 0.1 mg/g, 24.05 ± 0.2 mg/g으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of *Tetrapanax papyrifer* stem and *Akebia quinata* stem

Sample name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
<i>Tetrapanax papyrifer</i> stem	42.33 ± 0.28	23.54 ± 0.1
<i>Akebia quinata</i> stem	53.71 ± 0.27	24.05 ± 0.2

All values are expressed mean ± SEM of three replications.

2. DPPH free radical 소거능 분석

실험에 사용된 通草와 木通의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH free radical 소거능을 분석한 결과, 각각 DPPH free radical 소거능 IC₅₀값은 28.76±0.40 µg/ml, 25.48±0.53 µg/ml로 나타났으며, 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC₅₀값은 1.03±0.02 µg/ml로 나타났다 (Figure 1).

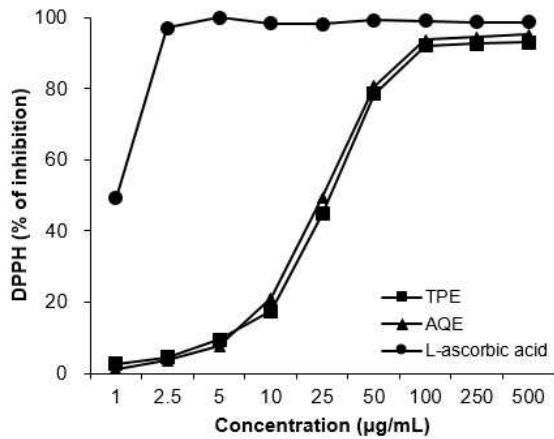


Figure 1. Scavenging activity of TPE and AQE on DPPH free radical. TPE group ; *Tetrapanax papyrifer* stem extract, AQE group ; *Akebia quinata* stem extract. All values are expressed mean±SEM of three replications.

3. ABTS radical 소거능 분석

실험에 사용된 通草와 木通의 항산화 활성을 확인하기 위해 ABTS radical 소거능을 분석한 결과, 각각 ABTS radical 소거능을 IC₅₀값으로 나타낼 때 71.23±1.43 µg/ml, 48.14±0.15 µg/ml로 나타났으며, 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC₅₀값은 3.46±0.04 µg/ml로 나타났다 (Figure 2).

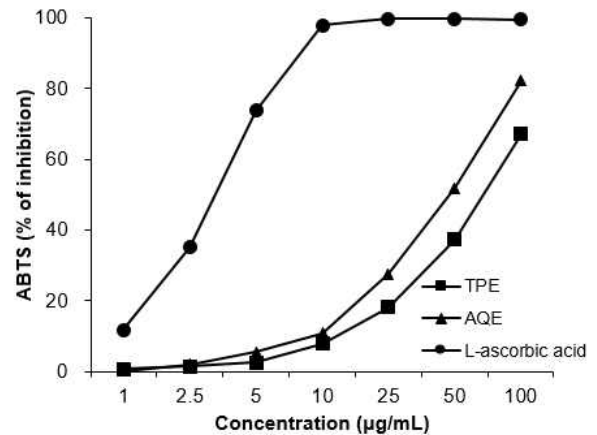


Figure 2. Scavenging activity of TPE and AQE on ABTS radical. TPE group ; *Tetrapanax papyrifer* stem extract, AQE group ; *Akebia quinata* stem extract. All values are expressed mean±SEM of three replications.

4. 체중과 식이효율 변화

체중의 변화를 측정된 결과, 정상군 65.0±7.13에 비해 대조군 76.9±5.61로 유의하게 증가하였으며 ($p<0.01$), 대조군 대비 INDO군 68.2±15.44, TPE군 66.4±6.71 ($p<0.01$), AQE군 50.6±4.70로 감소하였다. 특히, TPE군과 AQE군에서는 유의하게 감소함을 보여주었다 ($p<0.01$, $p<0.001$) (Table 2).

식이섭취량은 모든 군에서 유의성을 나타내지 않았다.

식이효율은 정상군 20.90±2.96, 대조군 25.15±2.23, INDO군 22.72±4.28, TPE군 22.93±1.90, AQE군 17.28±0.63로 나타났으며, 대조군 대비 AQE군에서 유의하게 감소하였다 (Table 3). 이는 木通의 투여는 항비만 효능도 지니고 있는 것으로 판단되어진다.

Table 2. Body weight change of the experimental groups.

Group	Initial (g)	Final (g)	change (g)
Normal	295.3 ± 9.54	360.3 ± 7.27	65.0 ± 7.13
Control	269.9 ± 3.05####	347.0 ± 5.97##	76.9 ± 5.61##
INDO	264.0 ± 8.58	332.2 ± 21.30	68.2 ± 15.44
TPE	265.6 ± 8.03	332.1 ± 14.08	66.4 ± 6.71**
AQE	276.9 ± 9.99	327.5 ± 13.26**	50.6 ± 4.70***

Results are mean±SD (n=8/group).

$p<0.01$, ### $p<0.001$ vs. Normal, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. Control

Normal group ; Normal rats.

Control group ; MIA-induced and DW were administrated to osteoarthritis rats.

INDO group ; MIA-induced and 5 mg/kg of Indomethacin were administrated to osteoarthritis rats.

TPE group ; MIA-induced and 200 mg/kg of *Tetrapanax papyrifer* stem extract were administered to osteoarthritis rats.

AQE group ; MIA-induced and 200 mg/kg of *Akebia quinata* stem extract were administered to osteoarthritis rats.

Table 3. Body weight gain, food intakes, food efficiency ratio.

Group	Body weight gain (g/day)	Food intakes (g/day)	Food efficiency ratio (FER, %)
Normal	4.81 ± 0.60	23.06 ± 0.43	20.90 ± 2.96
Control	5.59 ± 0.30 ^{##}	22.26 ± 0.85	25.15 ± 2.23
INDO	5.00 ± 0.46	22.30 ± 2.51	22.72 ± 4.28
TPE	4.80 ± 0.39 ^{**}	20.95 ± 0.43	22.93 ± 1.90
AQE	3.61 ± 0.13 ^{***}	20.88 ± 0.49	17.28 ± 0.63 ^{**}

Results are mean±SD (n=8/group).
^{##}p<0.01 vs. Normal, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 vs. Control
 Other legends are the same as Table 2.

5. 뒷다리 체중 부하의 변화

상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 분석한 결과, MIA 유발 7일 후에 정상군 49.91±1.64, 대조군 36.02±3.13, INDO군 43.84±4.25, TPE군 37.75±3.70, AQE군 41.99±5.93로 나타났으며, 정상군 대비 유의하게 대조군에서 감소하였으나, 반면에 INDO군과 AQE군에서 대조군대비 유의적으로 증가하였다(p<0.001, p<0.01, reps).

한편, 14일 후에는 정상군 50.38±1.27, 대조군 34.17±9.15, INDO군 45.49±0.89, TPE군 39.10±4.08, AQE군 43.10±2.79로 나타났으며, 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 감소하였으나, 반면에 INDO군과 AQE군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다(p<0.001, p<0.01)(Table 4, Figure 3).

Table 4. The changes of hind paw weight distribution.

Group	0 day	7 days	14 days
Normal	50.65 ± 1.67	49.91 ± 1.64	50.38 ± 1.27
Control	32.81 ± 7.61 ^{###}	36.02 ± 3.13 ^{###}	34.17 ± 9.15 ^{###}
INDO	32.50 ± 7.19	43.84 ± 4.25 ^{***}	45.49 ± 0.89 ^{***}
TPE	33.32 ± 6.72	37.75 ± 3.70	39.10 ± 4.08
AQE	32.50 ± 7.23	41.99 ± 5.93 ^{**}	43.10 ± 2.79 ^{**}

Results are mean±SD (n=8/group).
^{###}p<0.001 vs. Normal, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 vs. Control
 Other legends are the same as Table 2.

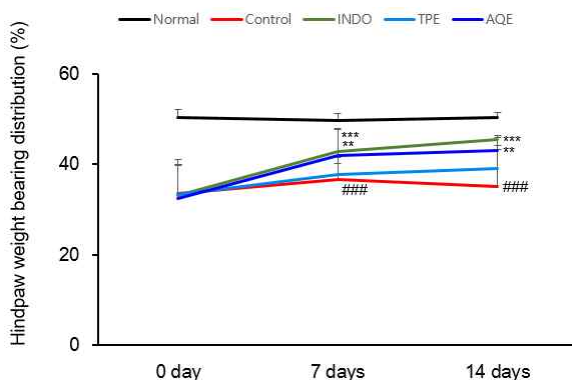


Figure 3. The changes of hind paw weight distribution.
 Results are mean±SD (n=8/group).
^{###}p<0.001 vs. Normal, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 vs. Control
 Other legends are the same as Table 2.

6. 간 기능 지표 분석

간 기능 지표인 GOT의 수치(IU/L)를 분석한 결과, 정상군 44.37±1.04 대비 대조군 51.75±1.26(p<0.01)로 유의하게 증가하였으나, 대조군 대비 INDO군 44.88±1.96(p<0.01)과 AQE군 39.25±2.01(p<0.001)로 유의하게 감소하였다. 반면, TPE군은 48.14±1.74로 감소하는 경향을 보였다.

또한, GPT의 수치(IU/L)의 경우, 정상군 11.57±0.87 대비 대조군 16.98±0.43 으로 유의하게 증가하였으나(p<0.001), 대조군 대비 INDO군 13.67±0.81(p<0.001)과 AQE군 11.38±0.62(p<0.001)로 유의하게 감소하였다. 반면, TPE군은 16.27±0.4로 감소하는 경향을 보였다(Figure 4).

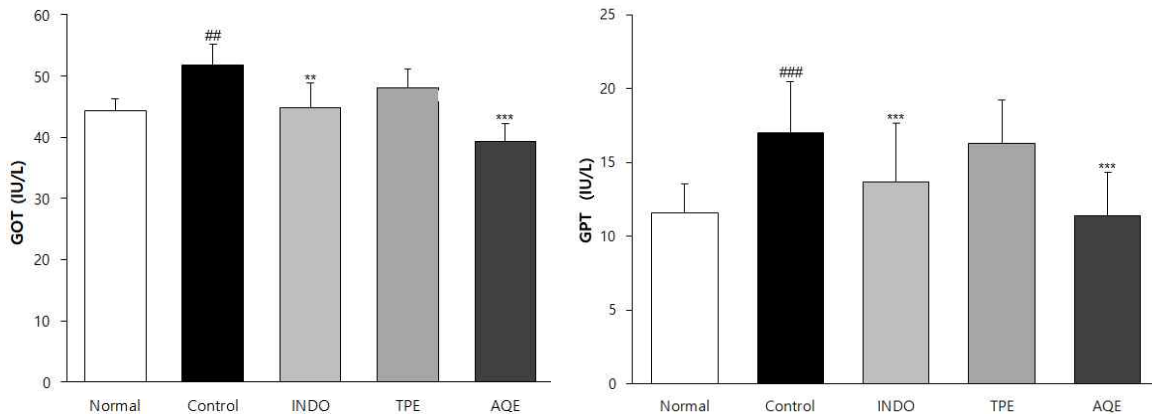


Figure 4. Effect of TPE and AQE on GOT and GPT. Results are mean±SD (n=8/group). ^{##}*p*<0.01, ^{###}*p*<0.001 vs. Normal, ^{**}*p*<0.01 ^{***}*p*<0.001 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

7. 관절조직 내 산화적 스트레스 관련 p47^{phox}와 p22^{phox} 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 p47^{phox}와 p22^{phox}의 단백질 발현을 확인하였다. p47^{phox}와 p22^{phox}의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.11 대비 대조군 1.41±0.07에서 p47^{phox} 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.05), 대조군 대비 INDO군 0.99±0.09(*p*<0.01)와 AQE군 0.98±0.10(*p*<0.01)

로 유의하게 감소하였다. 반면, TPE군은 1.14±0.13로 감소하는 경향을 보였다.

또한, p22^{phox}는 정상군 1.00±0.06 대비 대조군 1.44±0.12로 p22^{phox} 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.01), 대조군 대비 INDO군과 AQE군은 각각 1.12±0.05와 1.10±0.08로 유의하게 감소하였다(*p*<0.05). 반면, TPE군은 1.22±0.09로 감소하는 경향을 보였다(Figure 5).

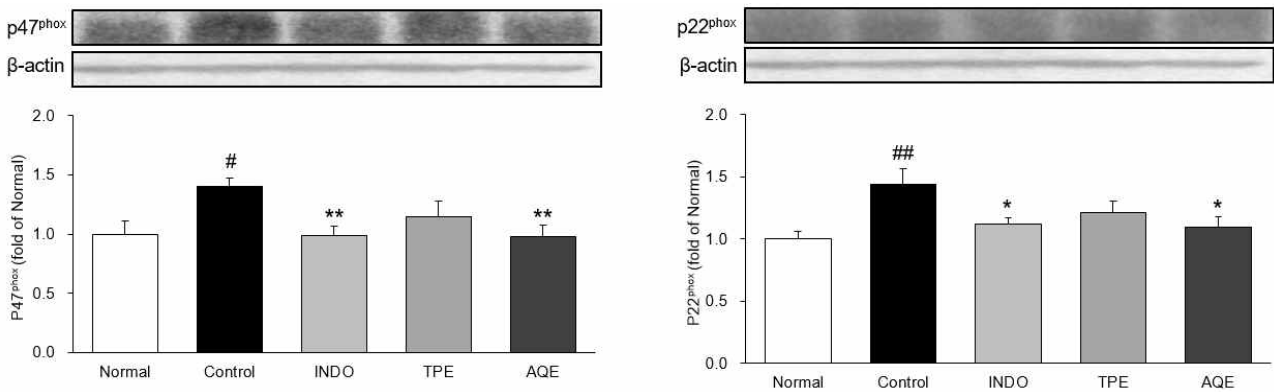


Figure 5. Effects of TPE and AQE on p47^{phox} and p22^{phox} expressions. Results are mean±SD (n=8/group). [#]*p*<0.05, ^{##}*p*<0.01 vs. Normal, ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

8. 관절조직 내 염증성 단백질 NF-κBp65와 p-IκBα 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 NF-κBp65와 p-IκBα의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.16 대비 대조군 2.30±0.17로 NF-κBp65의 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.001), 모든 약물 투여군에서 INDO군 1.50±0.18,

TPE군 1.56±0.18, AQE군 1.22±0.18로 유의하게 감소하였다(*p*<0.01, *p*<0.01, *p*<0.001).

또한, p-IκBα의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.08 대비 대조군 1.69±0.05로 p-IκBα의 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.001), 모든 약물 투여군에서 INDO군 1.26±0.11, TPE군 1.24±0.15, AQE군 1.06±0.10으로 유의하게 감소하였다(*p*<0.01, *p*<0.01, *p*<0.001)(Figure 6).

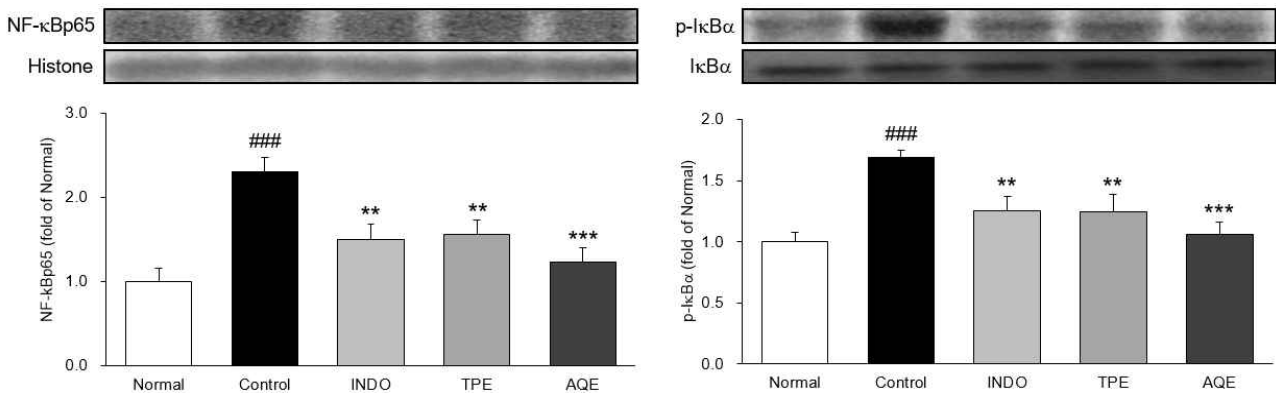


Figure 6. Effects of TPE and AQE on NF-κBp65 and p-IκBα expressions. Results are mean±SD (n=8/group). ###*p*<0.001 vs. Normal, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

9. 관절조직 내 염증성 매개인자 iNOS와 COX-2 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.03 대비 대조군 1.25±0.05로 iNOS의 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.001), 모든 약물 투여군에서 INDO군 0.97±0.03, TPE군 1.03±0.04, AQE군 1.02±0.04로 유의하게 감소하였다(*p*<0.001).

또한, COX-2의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.07 대비 대조군 1.46±0.07로 COX-2의 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.01), 모든 약물 투여군에서 INDO군 0.96±0.09, TPE군 1.09±0.14, AQE군 1.00±0.10로 유의하게 감소하였다(*p*<0.01, *p*<0.05, *p*<0.01)(Figure 7). 특히, INDO군과 AQE군은 정상수준까지 유의하게 감소하는 것을 보여주었다.

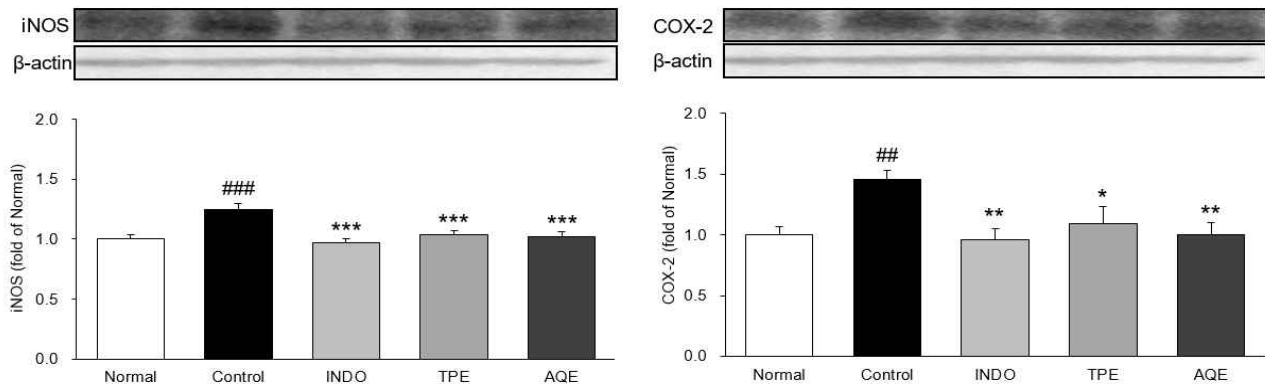


Figure 7. Effects of TPE and AQE on iNOS and COX-2 expressions. Results are mean±SD (n=8/group). ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 vs. Normal, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

10. 관절조직 내 염증성 cytokine TNF-α, IL-1β 및 IL-6 발현 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 TNF-α, IL-6, IL-1β의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, 정상군 1.00±0.13 대비 대조군 1.34±0.08에서 TNF-α 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.05), 대조군 대비 INDO군 0.85±0.11(*p*<0.01)와 AQE군 0.73±0.09(*p*<0.001)로 유의하게 감소하였다. 반면, TPE군은 1.05±0.10으로 감소하는 경향을 보였다.

0.14 대비 대조군 1.79±0.24에서 IL-1β 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.01), 대조군 대비 INDO군 1.21±0.08, TPE군 1.13±0.10, AQE군 1.07±0.15로 모든 약물 투여군에서 유의하게 감소하였다(*p*<0.05, *p*<0.01, *p*<0.01).

IL-6는 정상군 1.00±0.04 대비 대조군 1.61±0.18에서 IL-6 발현이 유의하게 증가하였으나(*p*<0.001), 대조군 대비 INDO군 1.14±0.08, TPE군 1.21±0.09, AQE군 1.06±0.03로 모든 약물 투여군에서 유의하게 감소하였다(*p*<0.01, *p*<0.05, *p*<0.001)(Figure 8).

또한, IL-1β의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±

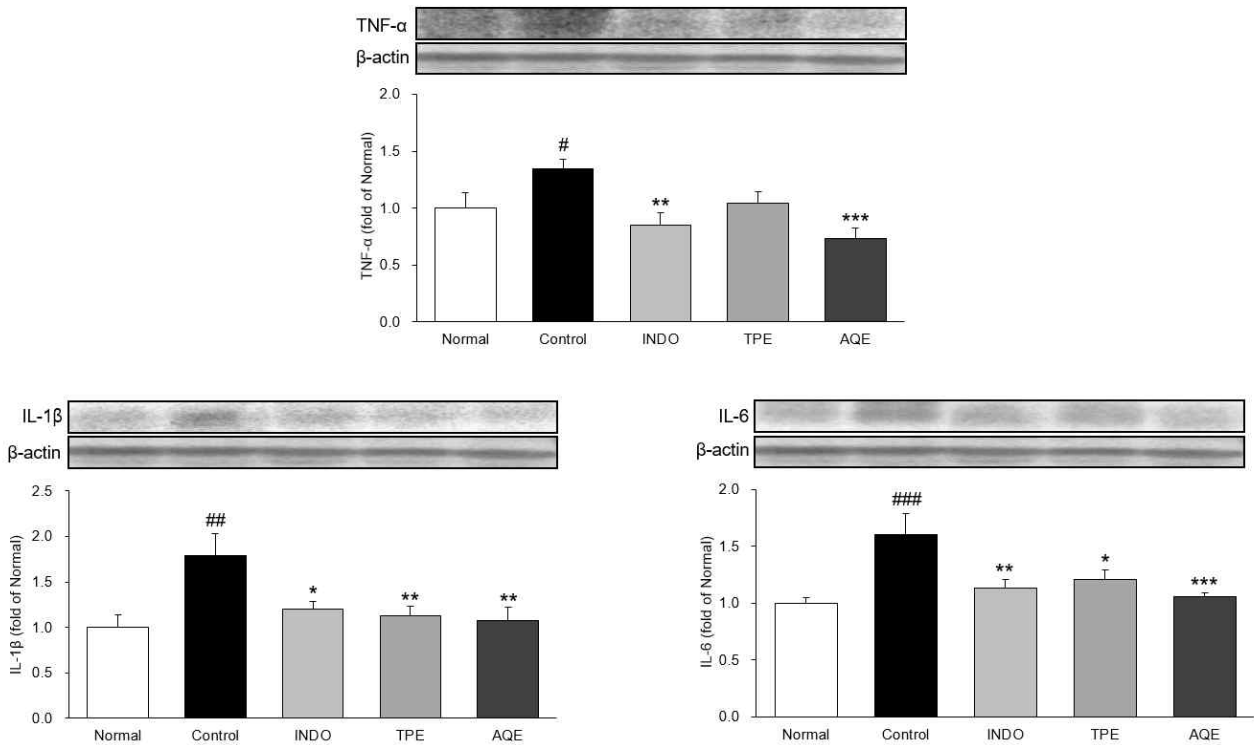


Figure 8. Effects of TPE and AQE on TNF- α , IL-6, and IL-1 β expressions. Results are mean \pm SD (n=8/group). # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 vs. Normal, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

11. 관절조직 내 항염증성 cytokine IL-4와 IL-10 발현 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 IL-4와 IL-10의 단백질 발현을 확인하였는데, 정상군 1.00 \pm 0.02 대비 대조군 0.66 \pm 0.07로 IL-4의 발현이 유의하게 감소하였으나(p <0.01), 모든 약물 투여군에서 INDO군 1.00 \pm 0.08, TPE군 0.96 \pm

0.13, AQE군 0.96 \pm 0.03로 유의하게 증가하였다(p <0.01, p <0.05, p <0.05).

또한, IL-10의 단백질 발현을 확인하였는데, 정상군 1.00 \pm 0.05 대비 대조군 0.80 \pm 0.04로 IL-10의 발현이 유의하게 감소하였으나(p <0.01), TPE군 1.03 \pm 0.07(p <0.05)과 AQE군 1.04 \pm 0.08(p <0.01)로 유의하게 증가하였다. 반면, INDO군은 0.94 \pm 0.04로 증가하는 경향을 보였다(Figure 9).

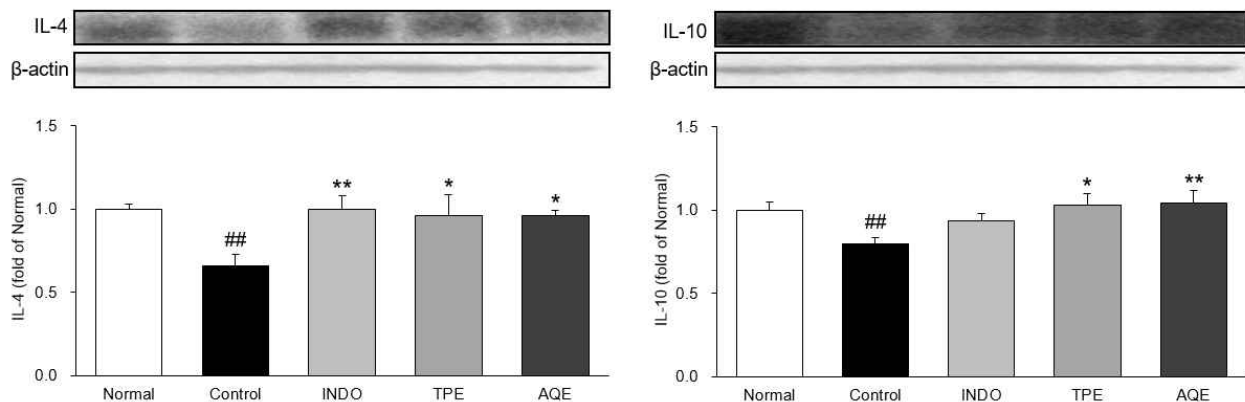


Figure 9. Effects of TPE and AQE on IL-4 and IL-10 expressions. Results are mean \pm SD (n=8/group). ### p <0.01 vs. Normal, * p <0.05, ** p <0.01 vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

12. 관절조직 내 콜라겐 관련 인자 발현 분석

1) Collagenases (MMP-1와 MMP-13) 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 MMP-1와 MMP-13의 단백질 발현을 확인하였는데, MMP-1은 정상군 1.00 ± 0.11 대비 대조군 1.69 ± 0.13 에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.001$), 대조군 대비 INDO군 1.34 ± 0.04 , TPE군 1.42 ± 0.06 , AQE군 1.31 ± 0.09 로 감소하였다. 특히, INDO군과 AQE군

에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

또한, MMP-13의 단백질 발현을 확인하였는데, 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.40 ± 0.10 에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.01$), 대조군 대비 INDO군 1.10 ± 0.08 , TPE군 1.12 ± 0.08 , AQE군 1.10 ± 0.06 으로 모든 약물군에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Figure 10).

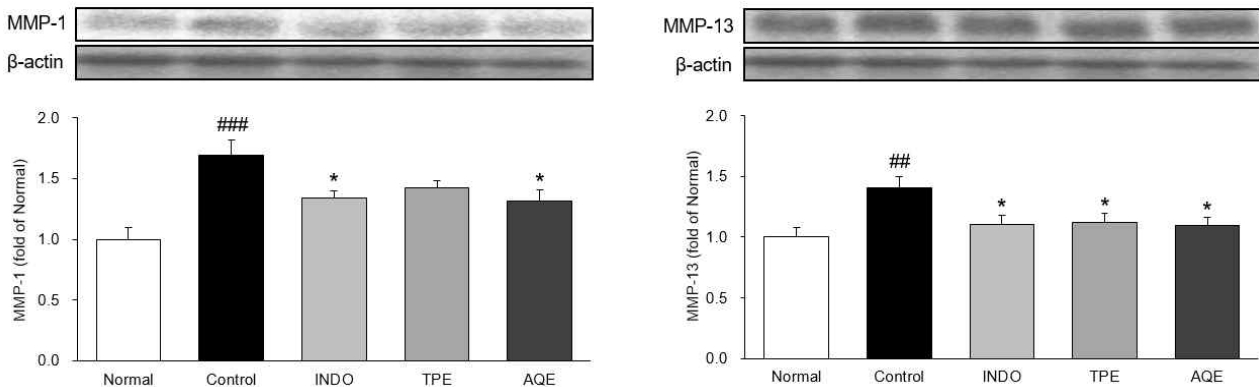


Figure 10. Effects of TPE and AQE on MMP-1 and MMP-13 expressions. Results are mean \pm SD (n=8/group). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Normal, * $p < 0.05$ vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

2) Gelatinases (MMP-2와 MMP-9) 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현을 확인하였는데, MMP-2는 정상군 1.00 ± 0.11 대비 대조군 2.03 ± 0.27 에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.01$), 대조군 대비 INDO군 1.17 ± 0.15 , TPE군 1.56 ± 0.28 , AQE군 1.43 ± 0.19 로 감소하였으며 INDO군에서만 유의한

감소를 보였다($p < 0.05$).

또한, MMP-9의 단백질 발현을 확인하였는데, 정상군 1.00 ± 0.07 대비 대조군 1.36 ± 0.10 에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$), 대조군 대비 INDO군 1.00 ± 0.14 , TPE군 1.17 ± 0.15 , AQE군 1.04 ± 0.04 로 감소하였으며 INDO군에서만 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$)(Figure 11).

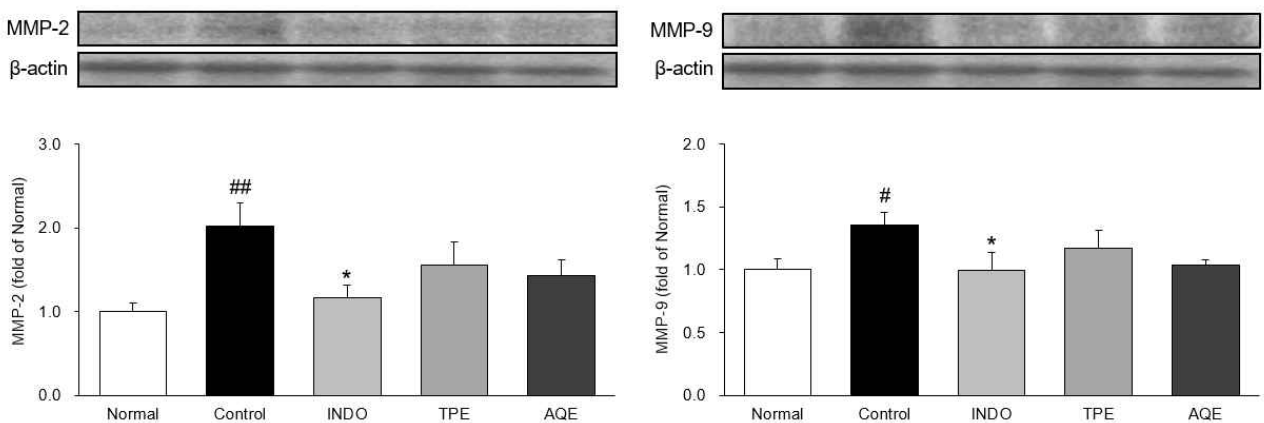


Figure 11. Effects of TPE and AQE on MMP-2 and MMP-9 expressions. Results are mean \pm SD (n=8/group). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Normal, * $p < 0.05$ vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

3) Stromelysin (MMP-3) 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 MMP-3의 단백질 발현을 확인하였는데, 정상군 1.00 ± 0.10 대비 대조군 1.64 ± 0.09 에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.01$), 모든 약물 투여군에서 INDO군 1.17 ± 0.14 , TPE군 1.18 ± 0.15 , AQE군 1.11 ± 0.11 로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)(Figure 12).

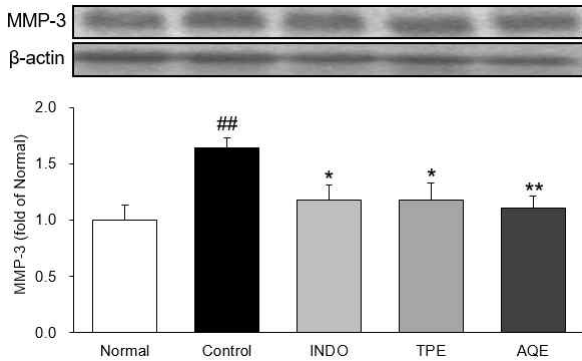


Figure 12. Effects of TPE and AQE on MMP-3 expression. Results are mean ± SD (n=8/group). ## $p < 0.01$ vs. Normal, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

13. 관절조직 내 항산화 관련 단백질 SOD, Catalase, Gpx-1/2 및 분석

관절 조직에서 western blot을 실시 후 SOD, Catalase 및 Gpx-1/2 발현을 측정하였다. 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 0.75 ± 0.06 에서 SOD는 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), INDO군 1.05 ± 0.08 , TPE군 0.82 ± 0.07 , AQE군 1.10 ± 0.09 로 대조군 대비 증가하였다. TPE군을 제외한 INDO군과 AQE군에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

Catalase에서는 정상군 1.00 ± 0.04 대비 대조군 0.71 ± 0.02 에서 Catalase는 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), INDO군 0.96 ± 0.06 , TPE군 0.91 ± 0.08 , AQE군 0.88 ± 0.06 으로 대조군 대비 증가하였다. Catalase에서는 INDO군과 TPE군에서만 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$, $p < 0.05$).

또한, Gpx-1/2에서는 정상군 1.00 ± 0.05 대비 대조군 0.80 ± 0.05 에서 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$), INDO군 0.96 ± 0.05 , TPE군 1.04 ± 0.06 , AQE군 0.94 ± 0.05 로 대조군 대비 증가하였다. Gpx-1/2에서도 Catalase 마찬가지로 INDO군과 TPE군에서만 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Figure 13).

이를 통해 INDO군과 TPE군은 Catalase와 Gpx-1/2의 발현을 유의하게 조절하나, AQE군은 SOD 발현을 유의하게 조절하여 항산화 효과를 발휘하는 것으로 판단된다.

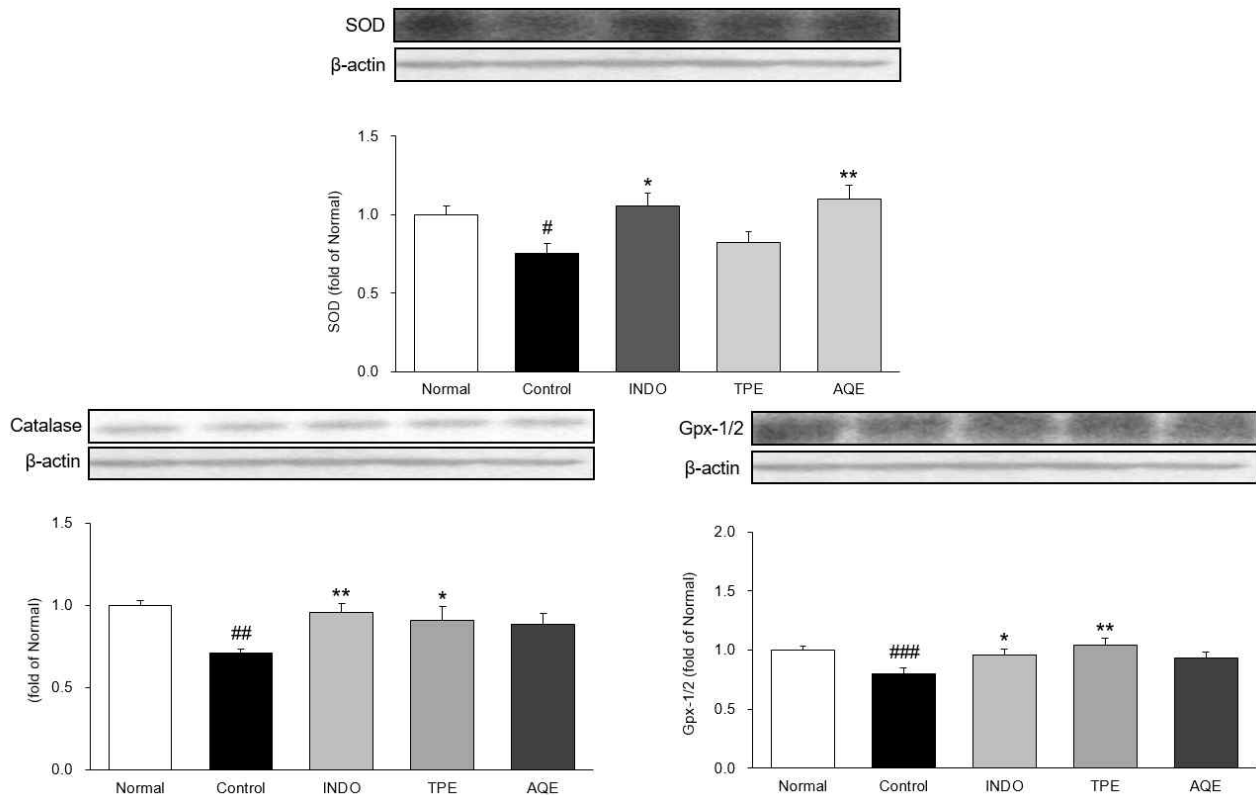


Figure 13. Effects of TPE and AQE on SOD, Catalase, and Gpx-1/2 expressions. Results are mean ± SD (n=8/group). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Normal, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control. Other legends are the same as Table 2.

14. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

1) Hematoxylin/Eosin staining

H/E(Hematoxylin/Eosin staining) 염색을 통하여 손상된 연골의 복구 상태를 관찰한 결과, 정상군은 연골의 변형이 일어나지 않았으며, 대조군의 경우에는 골관절염이 유발되어 불규

칙하고 탈락된 연골 표면과 같은 연골의 변성이 뚜렷하게 나타났다. INDO군과 TPE군은 대조군과 비교했을 시 정상 상태에 근접하여 MIA 유발에 의한 손상이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다 (Figure 14).

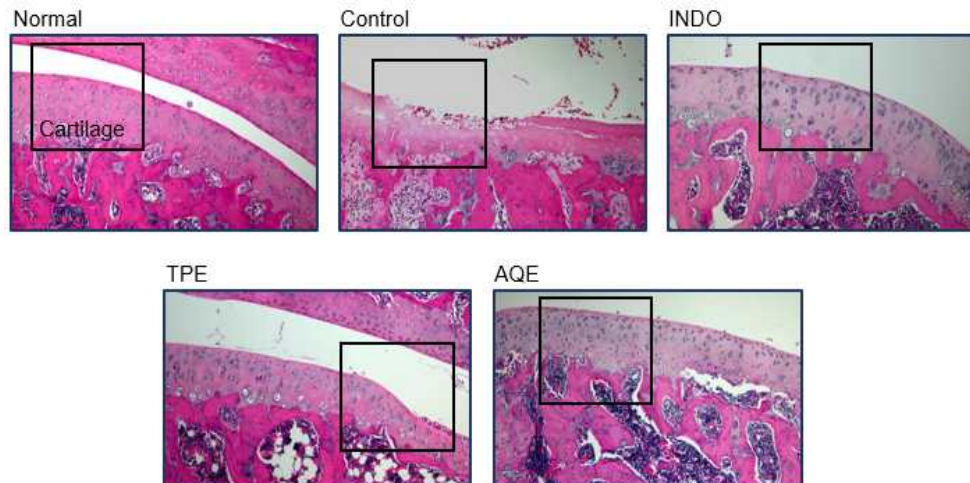


Figure 14. Histological observation on joint (H/E staining). (magnification, x100).
Other legends are the same as Table 2.

2) Safranin-O staining

Safranin-O stain을 실시하여 관절 조직의 proteoglycan 파괴 정도를 관찰한 결과, 대조군의 경우에는 관절조직이 변형되고 골관절염이 유발되었으며, 대부분의 proteoglycan이

파괴되어 연골의 형태학적 변화를 야기했다. 반면 약물 투여군에서는 대조군과 비교했을 시 proteoglycan의 소실과 관절조직의 변형이 억제되는 것으로 관찰되었다 (Figure 15).

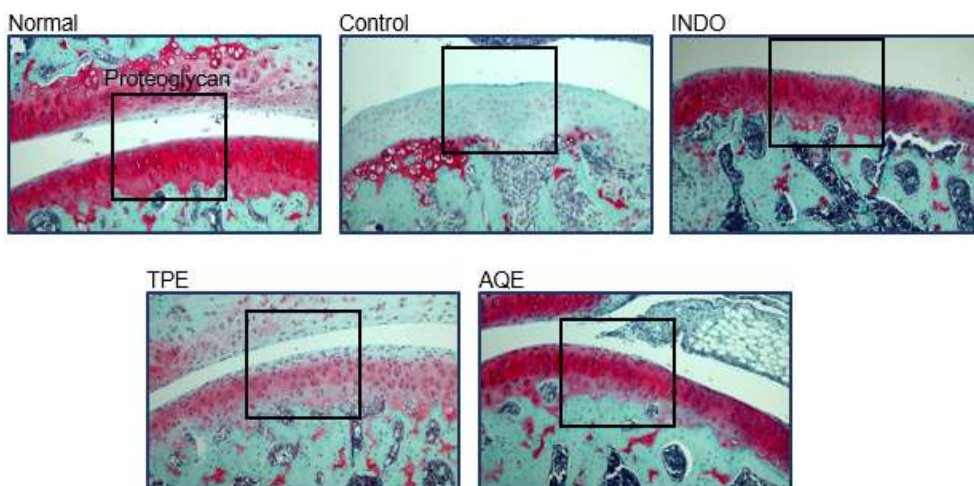


Figure 15. Histological observation on joint (Safranin-O staining). (magnification, x100).
Other legends are the same as Table 2.

IV. 고찰

通草는 《本草拾遺》에 처음으로 수록된 한약재이며, 두릅나무과(Araliaceae) 관목인 통탈목(通脫木) *Tetrapanax papyriferus* (Hook.) K. Koch.의 莖髓를 건조한 것이다^{9,10}. 通草의 성질은 약간 차고^{9,10}, 맛은 달고 습습하다^{9,10}. 주로 肺, 胃經으로 들어가서 효능을 발휘한다^{9,10}. 通草는 淸熱利水滲濕, 通氣下乳하는 효능이 있으며, 주로 水腫, 尿少, 小便短赤, 小便不利, 濕熱尿赤, 淋症, 淋病澀痛, 濕病初起, 乳汁不通, 乳汁稀少 등의 증상을 치료한다^{9,10}.

通草의 유효성분으로는 oleanane 유형의 triterpene, papyroside LA-LD, papyroside LE-LH, 플라보노이드와 벤젠 유도체, inosite, papyriogenin A-G, papyroside L-IIad 및 quercetin 등이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다^{22,23,24,25}.

通草에 관한 실험연구를 보면, 통초 추출물이 항산화 활성과 미백활성이 있음이 밝혀졌고¹¹, 분만 후 어미 생쥐의 유선조직을 발달시켜 모유분비를 촉진하는 효과¹²가 있는 것으로 밝혀졌다.

木通은 《神農本草經》에 처음으로 수록된 한약재이며, 으름덩굴과(Lardizabalaceae) 낙엽 덩굴성 관목인 으름(木通) *Akebia quinata* Decne., 三葉木通 *Akebia trifolia* (Thunb.) Koidz.[=*Clematis trifolia* Thunb.], 白木通 *Akebia trifolia* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels.) Rehd.의 목질경(木質莖)이다^{9,10}. 性味는 苦寒하다^{9,10}. 주로 心, 小腸, 膀胱經으로 들어가서 효능을 발휘한다^{9,10}. 降火利尿消腫, 通經下乳, 淸熱解毒, 活血通痺, 通利血脈하는 효능이 있으며, 주로 熱淋, 血淋, 赤濁, 濕毒水腫, 癰閉, 濕脚氣, 口舌生瘡, 心煩, 胸中煩熱, 尿赤, 小便短赤, 淋濁, 閉經, 痛經, 乳汁不通, 濕瘡, 癩病, 咽喉腫痛, 咽喉疼痛, 熱痺, 風濕痺痛 등의 증상을 치료한다^{9,10}.

木通에 관한 실험 연구 결과를 살펴보면, 분만 후 어미 생쥐의 유선조직을 발달시켜 모유분비를 촉진하는 효과가 있으며¹², 진통효과가 있고¹³, 신부전 및 신기능 장애 개선효과^{14,15}가 있으며, 木通은 알코올로 인한 간의 지방병증 및 비장과 가슴샘의 위축성 변화 개선에 유효한 효과가 있음이 밝혀졌다¹⁶. 또한 에탄올 추출물은 혈압강하 작용이 있음을 밝혔다¹⁷.

한의학에서 관절염은 관절의 痺證의 범주에 해당하는 질환 중 하나로 이해되었으며⁶, 치료에서도 痺證의 치료법을 주로 이용했으며, 祛風寒濕, 補肝腎, 強筋骨, 活血祛瘀 등^{4,26}의 치료법을 활용한다.

그런데, 通草와 木通은 利尿通淋을 주 효능을 지니고 있는 약재이어서, 골관절염에 효과가 있을 것으로 판단되었고, 또 두 약재의 효능 감별도 할 필요가 있기에, 염증성 관절손상 동물 모델을 이용하여 두 약재 추출물의 염증 억제 효과를 분석해 보았다.

관절에서 염증반응의 매개체로 ROS(reactive oxygen species, 활성산소종)와 같은 산화스트레스의 생성은 유의한 관련이 있다²⁷. 通草와 木通의 항산화 활성을 평가하고자, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그 결과, 通草와 木通의 총 폴리페놀 함량은 42.33±0.28 mg/g와 53.71±0.27 mg/g으로 木通의 총 폴리페놀 함량이 더 우수하였다. 通草와 木通의 총 플라보

노이드 함량은 23.54±0.1mg/g와 24.05±0.2 mg/g로 분석되어 역시나 木通의 함량이 더 높았다(Table 1). 한편, 通草와 木通의 DPPH radical 소거능 IC₅₀은 28.76±0.53 μg/ml와 25.48±0.53 μg/ml였고(Figure 1), ABTS radical 소거능 IC₅₀은 71.23±1.43 μg/ml와 48.14±0.15 μg/ml로 확인되어(Figure 2), 通草보다 木通의 DPPH와 ABTS free radical 소거능이 더 우수함을 알 수 있었다.

MIA로 유도된 골관절염 동물 모델에서는 체중의 증가가 나타나는데²⁸, 체중의 변화를 관찰한 결과, 通草와 木通 투여군 모두에서 유의하게 감소하였다(Table 2). MIA로 유도된 골관절염 동물 모델에서 식이효율은 높아지는데²⁸, 木通 투여군에서 유의하게 감소하였다(Table 3).

MIA로 한쪽 다리 무릎에 골관절염이 유발되면 통증으로 인하여 유발된 다리에 힘을 주지 못한다. 뒷다리 체중부하를 측정한 결과, Control군에서는 유의하게 정상군에 비해서 감소하였으나, 通草 대비 木通의 투여는 대조군 대비 뒷다리 체중부하를 유의하게 증가시켜 通草보다 통증을 더 완화시키는 것으로 나타났다(Table 4, Figure 3).

간 기능 지표인 GOT의 수치(IU/L)를 분석한 결과, 木通 투여군에서 유의하게 감소하였다. 또한, GPT의 수치(IU/L)의 경우, 木通 투여군에서 유의하게 감소하였다(Figure 4).

ROS는 관절의 조직을 손상하는 대표적인 물질이다²⁹. H₂O₂는 조직에 직접적인 손상을 일으키지는 않지만 반응성 높은 HO·로 전환되어 손상을 야기한다²⁵. NOX4, p47^{phox} 및 p22^{phox}를 포함하는 세포막 단백질인 NADPH oxidase 또한 활성화가 되면 O₂⁻를 생성시킨다²⁸. 실험결과, 通草와 木通 두 시료 모두는 혈액의 ROS를 유의하게 감소시켰으며, 관절 조직에서 산화적 스트레스 공급원인 NADPH oxidase (p47^{phox}와 p22^{phox})의 발현은 木通의 투여로 유의하게 감소되었다(Figure 5).

NF-κB는 전사인자로, 염증, 면역기능, 세포사멸 등을 조절하는데, 정상상태에서는 IκBα(inhibitory kappa Bα)와 불활성 상태로 결합하여 세포질 내에서 존재하지만, 외부 자극에 의하여 IκBα의 인산화가 이루어지면 NF-κB는 세포 핵 내로 옮겨가서 염증성 단백질을 상승시키는데, 예를 들면 COX-2, iNOS, TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 상승을 촉발한다^{30,31}. 본 실험에서는 通草와 木通 약물 처리군은 IκBα의 인산화를 억제하여 NF-κB의 발현을 유의적으로 억제하였고(Figure 6), 염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2를 유의하게 줄였고(Figure 7), 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6는 木通 투여군에서는 모든 인자의 유의적인 감소가 나타났고, 通草 투여군에서는 IL-1β 및 IL-6 수치에서 유의적인 감소가 나타났다(Figure 8).

IL-4는 항염증성 사이토카인으로, 관절 연골에서 proteoglycan의 분해를 억제하여 강력한 연골 보호 효과를 보인다³². IL-10도 골관절염 과정에서 연골 보호 효과를 보이는데, aggrecan과 collagen type II의 합성을 자극한다^{33,34}. 본 실험 결과, 通草와 木通 투여군에서는 항염증성 단백질 인자인 IL-4와 IL-10의 발현을 유의하게 증가시켰다(Figure 9). 이러한 실험결과를 보면, 通草와 木通은 항염증 효과를 발휘하는데, 관절 조직에서 염증성 매개 인자들의 발현을 억제하며, 염증성 사이토카인의 분비를 억제하고, 항염증성 사이토카인의 분비 증가를 통하여 효과를 발휘한다고 생각된다.

MMP(기질금속단백질분해효소, matrix metalloproteinases)는 단백질 분해 효소 군으로 사람에는 23가지가 있는데, 세포의 기질을 분해하고 조직의 리모델링에서 여러 가지 기능을 조절한다. 다양한 MMP의 발현이 골관절염 환자의 연골 조직에서 나타나며, TIMPs에 의해서 MMP의 작용이 길항된다^{35,36}. TIMP(기질금속단백질분해효소 조직억제제, tissue inhibitor of metalloprotenase)는 MMP의 활성화된 부위와 결합해서 MMP의 활성을 비가역적으로 저해한다. 다양한 MMP 중에서 MMP-1은 파괴과정 초기에 중요한 역할을 하며, 세포의 기질을 파괴하는 주된 역할을 담당하는데, 이러한 분해 과정은 MMP-2, MMP-9 등의 gellatinases의 작용에 의해 종결된다. MMP-3은 proteoglycan, collagen 및 기타 세포의 기질의 거대 분자를 포함하여 분해하는 역할을 하고, MMP-13은 collagen type II를 효율적이고 비가역적으로 절단하여 골관절염의 진행에 중요한 치료 표적이 된다³⁷. 본 실험 연구결과, 通草는 MMP-3, -13의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났으나, 木通의 투여는 콜라겐 분해 인자인 MMP-1, -3 및 -13의 발현을 유의하게 감소시켰다. 이상의 결과를 통해서, 木通이 通草 대비 콜라겐 관련인자의 발현을 더 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다(Figure 10, 11, 12).

ROS를 제거하는 항산화 효소단백질에는 SOD, Catalase, glutathione peroxidase (GPx), Heme oxygenase (HO)이 있다³⁸. 항산화 효소 관련 단백질의 발현량을 확인한 결과, 通草는 Catalase와 GPx-1/2를 경유해서 발현을 유의하게 증가시켰고, 木通은 SOD를 경유하여 발현을 유의하게 증가시켰다(Figure 13).

골관절염이 유발되면 관절 조직의 변성이 뚜렷하게 나타난다²⁸. H/E와 Safranin-O 염색을 실시하여 골관절염의 조직 병리학적 변화를 관찰한 결과, 通草 대비 木通의 투여는 연골의 변성이 억제되었고, ECM의 구성성분인 proteoglycan의 손상을 효과적으로 억제함을 보여주고 있다(Figure 14, Figure 15).

이상의 실험결과로 보면, 通草와 木通은 MIA로 유발된 골관절염의 염증 억제 및 연골 변성을 개선하며, 通草 대비 木通의 투여가 더 효과적으로 개선시킴을 알 수 있다.

V. 결 론

본 연구는 通草와 木通의 물 추출물 공급이 MIA로 유도된 골관절염 동물 모델에 미치는 효과를 평가하기 위하여 실시하였는데, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 通草와 木通의 항산화 활성을 평가하기 위하여 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그 결과, 通草와 木通의 총 폴리페놀 함량은 42.33 ± 0.28 mg/g와 53.71 ± 0.27 mg/g으로 木通의 총 폴리페놀 함량이 더 우수하였다. 通草와 木通의 총 플라보노이드 함량은 23.54 ± 0.1 mg/g

와 24.05 ± 0.2 mg/g로 분석되어 역시나 木通의 함량이 더 높았다. 한편, 通草와 木通의 DPPH radical 소거능 IC₅₀은 28.76 ± 0.53 μ g/ml와 25.48 ± 0.53 μ g/ml였고, ABTS radical 소거능 IC₅₀은 71.23 ± 1.43 μ g/ml와 48.14 ± 0.15 μ g/ml로 확인되어 通草보다 木通의 DPPH와 ABTS free radical 소거능이 더 우수함을 알 수 있었다.

2. 通草 대비 木通의 투여는 대조군 대비 뒷다리 체중 부하를 유의하게 증가시켜 通草보다 통증을 더 완화시키는 것으로 나타났다.
3. 通草와 木通 두 시료 모두는 혈액의 ROS를 유의하게 감소시켰으며, 관절 조직에서 산화적 스트레스 공급원인 NADPH oxidase(p47^{phox}와 p22^{phox})의 발현은 木通의 투여로 유의하게 감소하였다.
4. 通草와 木通 두 시료 모두는 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF- κ Bp65의 경로를 불활성화 시킴으로써 염증성 매개인자 COX-2와 iNOS와 염증성 cytokine IL-1 β 와 IL-6의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 반면, TNF- α 는 木通의 투여에 의해서만 유의하게 감소되었다.
5. 通草와 木通 두 시료 모두는 항염증성 단백질 인자인 IL-4와 IL-10의 발현을 유의하게 증가시켰다.
6. 通草는 MMP-3, -13의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났으나, 木通의 투여는 콜라겐 분해 인자인 MMP-1, -3 및 -13의 발현을 유의하게 감소시켰다. 이를 통해 木通이 通草 대비 콜라겐 관련인자의 발현을 더 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다.
7. 항산화 효소 관련 단백질의 발현량을 확인한 결과, 通草는 Catalase와 GPx-1/2를 경유해서 발현을 유의하게 증가시켰고, 木通은 SOD를 경유하여 발현을 유의하게 증가시켰다.
8. 通草 대비 木通의 투여는 조직병리학적 분석에서 연골의 변성을 억제함을 보여주고 ECM의 구성성분인 proteoglycan의 손상을 효과적으로 억제함을 보여주었다.

이상의 결과로 판단컨대, 通草 대비 木通의 투여는 MIA로 유발된 골관절염의 염증 억제 및 연골 변성을 더 효과적으로 개선시킴으로써 연골보호 효과가 通草 보다 木通이 더 우수한 것으로 나타났다.

References

1. Jae In Jung, Hyun Sook Lee, Ryong Kim, and Eun Ji Kim, Anti-Osteoarthritis Effect of Enriched Boswellia serrata Gum Resin Extract in SW1353 Chondrocytes, J Korean Soc Food Sci Nutr. 2023 ; 52(5) : 460-472. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2023.52.5.460>
2. Lee HS. 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. J Korean DietAssoc. 2014 ; 20(2) : 99-109.
3. Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. J Knee Surg. 2011 ; 24 : 251-64.
4. Min Ju Kim, Jin A Lee, Mi-Rae Shin, Hae-Jin Park, Seong-Soo Roh. Improvement Effect of Corni Fructus 30% Ethanol Extract by MIA-Induced Osteoarthritis Animal Model. Kor. J. Herbol. 2020 ; 35(1) : 35-44.
5. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA). Korea Health Statistics 2021 : Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VIII -3). 2022 [cited 2023 Sep. 30]. Available from : https://knhanes.kdca.go.kr/knhanes/sub04/sub04_04_01.do.
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) : 1483-90.
7. Combe, R., Bramwell, S. and Field, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis : a model of chronic nociceptive pain in rats. Neurosci. Lett. 2004 ; 370 : 236-240.
8. Guzman, R. E., Evans, M. G., Bove, S., Morenko, B. and 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 : 619-624.
9. Buil Seo, Kukyoung Jung. Transparent Herbolology. Daegu : The publication department of Daegu Haany University. 2012 : 423-424.
10. The textbook compilation committee of Korean herbolology. Korean herbolology. Seoul : Younglimsa, 2021 : 351-354.
11. Eon-Joo Roh, Byung-Kwan Kim, Duck-Sool Kim. Antioxidative Activity and Antiaging Effects of *Tetrapanax papyriferum* extract J. of the Korean Oil Chemists' Soc. 2011 ; 28(2) : 219-224.
12. Chia-Wei Lee, Eun-Hee Lee, Chang-Hyun Lee, Hong-Jun Kim. Effect of Melandrii Herba, *Akebia quinata* Decaisne, and *Tetrapanax papyriferus* on milk secretion and lactation related factors in postpartum mice. J. Korean Obstet Gynecol. 2018 ; 31(2) : 1-17.
13. Kwon Oh-Gyu, Kim Kwang-Joong. Study on the analgesic effects of several herbal drugs and their synergistic effects. J. of Oriental Physiology. 1999 ; 14(2) : 127-137.
14. Jin Bae Kim, Seung Hyun Noh, Ho Young Choi. Study on the efficiency of Caulis Akebiae, Caulis Aristolochiae Manshuriensis and Caulis Clematidis Armandii on acute renal injury. The Korea Journal of Herbolology. 1998 ; 13(1) : 161-171.
15. Oh snagdeok, Cho donghyun, Doo hokyung, Ahn seyoung. Effect of Akebia quinata Dence and Stephania tetrandra S. Moore on rats with acute renal failure induced by gentamicin sulfate. K.H.M. 1994 ; 10(1) : 13-25.
16. Ji Hye Lee, Bu Il Seo. Effects of *Akebia quinata* extract on alcohol-induced damage of liver, spleen and thymus in rats. Kor. J. Herbolology. 2021 ; 36(2) : 11-17.
17. Ho Yun Kang. A Study on the Hypotensive Action of Akebiae Lignum Ethanol Extract in Rabbits. J Korean Pharm Sci. 1979 ; 9(2) : 222-230.
18. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. J biol chem. 1912 ; 12 : 239-243.
19. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. J sci food agric. 1994 ; 64 : 155-161.
20. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 26 : 1199-1200.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radic biol med. 1999 ; 26(9-10) : 1231-1237.
22. Chung, Sun-hee. Effects of *Tetrapanax papyriferum* Extracts on the KB Human Oral Squamous Carcinoma Cells Department of Alternative Medicine. Graduate School of Health Science Chosun University. 2010.
23. Ho, J.C., C.M. Chen and L.C. Row. Flavonoids and benzene derivatives from the flowers and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. J. Nat. Prod. 2005 ; 68(12) : 1773-1775.
24. Ho, J.C., C.M. Chen and L.C. Row. Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. Phytochemistry. 2007 ; 68(5) : 631-635.
25. Kosima, K., I. Saracoglu, M. Mutsuga and Y. Ogihara. Triterpene saponins from *Tetrapanax papyriferum*

- Koch, K. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1996 ; 44(11) : 15–18.
26. Kyungmin Baek, Yu-min An, Mi-Rae Shin, MinJu Kim, JinA Lee, Seong-Soo Roh. Protective effect of Corni Fructus extracts on MIA-induced animal model of osteoarthritis : Effect of Corni Fructus extracts on OA. *J. Int. Korean Med.* 2020 ; 41(1) : 1–13. [http : //dx.doi.org/10.22246/jikm.2020.41.1](http://dx.doi.org/10.22246/jikm.2020.41.1).
27. Goldring, S. R. Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 2003 ; 73 : 97–100.
28. Lee Soo Hwa, Seo Bu-II, Chondroprotective Effects of *Salviae Plebeiae Herba* in a Rat Model of Osteoarthritis. *J.A.O.M.* 2021 ; 21(1) : 11–42.
29. Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Free Radic Biol Med.* 2019 ; 132 : 90–100.
30. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B : a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997 ; 20(6) : 252–258.
31. Park SH, Lee HJ, Ryu JH, Lee SY, Shin HD, Hong JH, Seok JH, Lee CJ. Effects of Silibinin and Resveratrol on Degradation of I κ B and Translocation of NF- κ B p65 Induced by Tumor Necrosis Factor- α in Cultured Airway Epithelial Cells. *Yakhak Hoeji.* 2014 ; 58(1) : 1–6.
32. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrisian Matrix metalloproteinases : they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001 ; 13(5) : 534–540.
33. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000 ; 59(6) : 455–461.
34. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet Mol Res.* 2015 ; 14(4) : 14811–14822.
35. Doi H, Nishida K, Yorimitsu M, Komiyama T, Kadota Y, Tetsunaga T, Yoshida A, Kubota S, Takigawa M, Ozaki T. Interleukin-4 downregulates the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin b expression by rat normal chondrocytes. *Acta Med Okayama.* 2008 ; 62(2) : 119–126.
36. Castrogiovanni P, Di Rosa M, Ravalli S, Castorina A, Guglielmino C, Imbesi R, Vecchio M, Drago F, Szychlińska MA, Musumeci G. Moderate Physical Activity as a Prevention Method for Knee Osteoarthritis and the Role of Synoviocytes as Biological Key. *Int J Mol Sci.* 2019 ; 20(3) : 511.
37. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014 ; 2014 : 561459.
38. Ma D, He J, He D. Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020 ; 84(2) : 402–410.