

알긴산이 연골세포에서 연골 기질의 생성과 전십자 인대 절제술로 유발한 흰토끼의 골관절염에 미치는 영향

강한샘 · 김광윤 · 정일 · 오성덕 · 김창훈 · 심봉섭 · 박근형¹ · 오석중*

(주)이코바이오 광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 산학협력관 804호 500-757,

¹전남대학교 농업생명과학대학 응용생물공학부 광주광역시 북구 용봉동

전남대학교 농업생명과학대학 응용생물공학부 500-757

Effects of Alginate on the Production of Type II Collagen in Chondrocytes and on the Osteoarthritic Model of White Rabbits

Han Saem Kang, Gwang Yun Kim, Il Jung, Sung Dug Oh, Chang Hoon Kim,
Bong Sup Shim, Keun Hyung Park¹ and Suk Jung Oh*

ECOBIO INC. Rm 802, TBI Center, Chonnam National University

¹Department of Biological & Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences,
Chonnam National University

Abstract – This study was carried out to examine the in vitro effects of alginate (LVA) which is low viscosity alginic acid, on collagen type II synthesis of chondrocytes and the in vivo effect, orally administered, on cartilage degradation. Rabbit articular chondrocytes were cultured in 35 mm dishes and then LVA was treated. The effects of LVA of various viscosity (86.5 cP(LVA1), 45.4 cP(LVA2), 21.2 cP(LVA3) and 9.6 cP(LVA4)) and various concentration (50, 100, 200 µg/ml of LVA4) on chondrocytes were determined by western blotting assay for the detection of collagen type II production. In western blotting assay, collagen type II production in chondrocytes were 1.00 in control, 0.95 in LVA1, 1.41 in LVA2, 1.57 in LVA3 and 1.58 in LVA4. Collagen type II production of various concentration of LVA4 were 1.00 in control, 1.24 in 50 µg/ml of LVA4, 1.52 in 100 µg/ml of LVA4 and 1.86 in 200 µg/ml of LVA4. Osteoarthritis (OA) was induced in 24 rabbits by unilateral anterior cruciate ligament transection (ACLT) and randomly divided into 6 groups. The experimental group was given oral administration of 0.5 ml/kg of saline(control), 12.5 mg/kg of LVA (A12.5), 25 mg/kg of LVA (A25), 50 mg/kg of LVA (A50), 75 mg/kg of LVA (A75) and 20 mg/kg of aceclofenac (AC) for 6 weeks after ACLT. All knees were harvested at 6 weeks after surgery and cartilage degradation was evaluated. Cartilage degradation in the control group was significantly more severe than that in the A25, A50 and A75 groups but AC group had no significant changes on the macroscopic grading scale.

Key words – Alginate, Osteoarthritis, Type II collagen

골관절염(osteoarthritis)이란 활막관절에 발생하는 퇴행성 비염증성 질환이다. 현재까지 정확한 병인은 밝혀지지 않았지만 관절연골에 대한 기계적 손상과 노령화에 따른 연골 조직의 퇴행적 변화 등 다양한 인자가 관여한다고 추측되고 있다.¹⁾ 전 세계 인구의 급격한 노령화로 관절염도 심각한 사회적 질환으로 문제시 되고 있다. 60세 이상 인구의 80% 이상이 관절염에 이환된 상태이며 그 중 절반은 관절염 증상을 나타낸다.²⁾

관절연골은 혈관과 신경이 없는 조직으로 주 구성물질은 proteoglycan, 제 2형 콜라겐, 그리고 연골세포이다.^{3,4)} 건강한 연골은 proteoglycan과 제 2형 콜라겐과 같은 세포외 기질(extracellular matrix)의 합성과 분해가 역동적으로 균형을 이루는 상태이다. 반면, 관절염에 이환된 연골은 세포외 기질의 분해가 증가하고 그에 따른 기질의 합성이 부적절하여 균형이 깨어진 상태가 되고 그로 인하여 연골조직의 파괴를 유발한다.

이러한 관절 연골 조직의 퇴행적 반응을 조절하기 위한 수많은 연구가 있어왔지만, 근본적인 치료 방법은 아직 개

*교신저자(E-mail): sjoh555@hanmail.net
(FAX): 062-530-0784

발되지 않고 있다. 현재 수술적인 치료법 외에는 진통제나 비스테로이드성 항염증제 등을 이용한 통증완화에 그치고 있으며, 근본적인 치료를 위한 처방이라고 볼 수는 없다.^{5,6)} 또한, 이러한 약물의 장기 복용 시 간 기능 장애, 위장관계 출혈, 신 독성, 고혈압, 심혈관계질환 등의 부작용이 나타날 수 있다.⁷⁻⁹⁾ chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, hyaluronate 등과 같은 연골보호제(chondroprotective drugs)들은 부작용이 덜하고 연골세포보호, 연골에 가해지는 충격 완화, 연골영양공급, 연골대사보강 등의 효과가 있지만,¹⁰⁻¹²⁾ 더 많은 환자를 대상으로 장기간에 걸친 연구가 필요하다는 비판적인 의견도 있다.^{13,14)} 최근에는 세포 및 조직공학을 이용하거나 유전자를 이용한 치료법이 새로운 골관절염의 치료법으로 부상하고 있지만 아직은 태동단계이고 비용이나 기술면에서 보완해야 할 점이 많이 있다.

관절연골에는 다섯 종류의 콜라겐(제 2, 6, 9, 10, 11형)이 존재하며 그 중 제 2형 콜라겐이 90~95%를 차지한다. 제 2형 콜라겐은 연골의 틀을 이루는 물질로 연골에 가해지는 다양한 압력에 대항하여 연골의 형태를 유지한다. Proteoglycan은 하나의 protein core와 많은 수의 glycosaminoglycan(GAG) chain으로 구성되어 있으며 GAG를 구성하는 물질 중 하나인 chondroitin sulfate가 제 2형 콜라겐 섬유와 정전기적으로 결합하여 존재하며 연골의 수분을 잡아두는 역할을 한다. Proteoglycan은 분해와 합성의 주기가 짧아서 쉽게 분해 되는 반면 연골세포에서의 합성도 빠르게 일어난다. 하지만 제 2형 콜라겐은 한번 분해가 되면 합성되는 데 많은 시간이 소요된다. 또한, 콜라겐 섬유가 파괴되면 필연적으로 proteoglycan과 연골세포가 지탱할 곳을 잃어 활액으로 유리되게 된다. 그래서 Shingleton 등은 연골에서 제 2형 콜라겐을 유지하는 것이 관절염 치료에서 중요한 목적이라고 언급한 바 있다.¹⁵⁾ 현재까지 알려진 바로는 연골세포에서 제 2형 콜라겐의 생성을 촉진하는 물질은 insulin-like growth factor-I(IGF-I), transforming growth factor- β (TGF- β)와 같은 생체내에서 분비되는 성장호르몬으로^{16,17)} 천연물을 이용하여 연골세포에서 제 2형 콜라겐의 합성을 촉진시켰다는 보고는 없었다.

알긴산은 해조류에서 추출한 다당류로 β -D-mannuronic acid와 α -L-gluronic acid가 1-4결합한 monomer의 직선 사슬 구조를 가지고 있으며 해조류의 부위별, 크기 및 생육장소에 따라 두 단당류의 결합방법이 다르며 물성 또한 달라진다. 알긴산은 생체 내에서 다양한 생리 활성을 유발하며,^{18,19)} 약물전달, 세포이식과 같은 생물의학분야에서 다양하게 이용되고 있다. 또한, Masuda 등은 연골세포와 proteoglycan이 풍부한 알긴산 비드를 이용한 조직공학적인 인공 연골조직의 구성에 대하여 보고한 바 있다.²⁰⁾

본 연구에서는 가공된 알긴산인 LVA를 1차 배양한 토끼 연골세포에 처리하여 제 2형 콜라겐의 합성능 변화에 대해

서 알아보고, 실험적으로 관절염을 유발한 토끼에 용량별로 경구 투여하여 관절의 육안적인 검사를 통해 LVA의 골관절염에 대한 치료 효과를 평가해 보았다. 아울러 인의에서 관절염 치료제로 많이 쓰이는 비스테로이드성 소염진통제인 aceclofenac과 비교하여 LVA의 효과를 알아보았다.

재료 및 방법

재료 – 알긴산은 중국 청도해에서 4~6월에 채집한 갈조류의 일종인 *Laminaria japonica*에서 추출한 것을 Qingdao Bright Moon 사에서 공급받아 사용하였다. 추출 방법은, 잘게 부순 *Laminaria japonica*를 건조하여 묽은 산으로 처리, 원심분리하여 불순물을 제거하고 알코올로 탈수와 건조의 과정을 거쳐 분말화 하여 추출한 알긴산을 사용하였다. 알긴산을 중류수에 1%로 희석하고 viscometer(DV-I+®, Brookfield Co., USA)로 점도를 확인한 결과 86.5 cP(LVA1)가 나왔으며, 그것을 구연산 0.8%로 처리하고 120°C에서 시간별로 분해하여 점도를 45.4 cP(LVA2), 21.2 cP(LVA3), 9.6 cP(LVA4)로 낮춘 것을 실험에 사용하였다.

In vitro study

연골세포배양 – 2주령 토끼의 무릎관절에서 연골을 채취하여, serum-free DMEM 1.6 ml에 연골편을 담근 후 1% collagenase 0.4 ml를 처리하였다. 37°C CO₂ incubator에 넣은 후 30분마다 세포를 흔들어 주면서 6시간 정도 기다려 연골세포가 단일 세포로 분리되도록 하였다. 단일 세포로 분리된 것을 원심분리하여 상층액을 버리고 완전배지를 1 ml 넣어 토기 한 마리당 2 ml의 정상 배지에 희석하여 세포 혼탁액을 만들었다. 세포수를 산정한 후 희석하여 0.5 × 10⁵ cells/cm² 세포밀도가 되도록 각 dish당 필요한 양을 계산하여 세포혼탁액을 넣고 잘 흔들어 준 후 현미경으로 분산정도, 세포밀도 등을 확인한 다음 incubator에 넣었다.

LVA에 의한 Collagen type II 발현도 평가 – 배양연골세포가 담긴 각각의 dish를 무처리군(control), LVA1, LVA2, LVA3, LVA4로 나누고 control은 아무 처리를 하지 않고, LVA 처리군은 점도 86.5 cP(LVA1), 45.4 cP(LVA2), 21.2 cP(LVA3), 9.6 cP(LVA4)인 알긴산을 배지 1 ml당 LVA 100 µg의 농도로 각각 처리하였다. 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양 후 각각의 dish에서 단백질을 추출하고 전기영동기로 분획 후 anti-type II collagen antibody(Chemicon international, CA)를 사용하여 western blot을 실시, LVA에 의한 collagen type II의 발현도를 평가해 보았다. 여기서 collagen type II의 발현도가 가장 높게 나온 점도의 LVA를 선택하여 새로운 dish에 control, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 LVA 처리군으로 나누어 다시 collagen type II의 발현도를 비교해 보았다. western blotting으로 나온 결과는 면적인식 프로그램(Quantity One, BIO-RAD, USA)을 통하여 밴드의

Table I. Grading of cartilage surface at femoral condyle for gross observation

Grade 1 (Normal)	Surface appears normal and does not retain any ink
Grade 2 (Minimal fibrillation)	Site appears normal before staining, but retains the indian ink as elongated specks or light gray patches
Grade 3 (Overt fibrillation)	The cartilage is velvety in appearance and retains ink as intense black patches
Grade 4 (Erosion or Ulceration)	Loss of cartilage exposing the underlying bone

크기를 수치로 나타내었다.

In vivo study

실험 동물 – 체중 2.6~3.2 kg의 수컷 백색 토끼를 대조군 (control), LVA 12.5 mg/kg(A12.5), LVA 25 mg/kg(A25), LVA 50 mg/kg(A50), LVA 75 mg/kg(A75), aceclofenac(에어탈정, 대웅제약) 20 mg/kg(AC) 투여군으로 나누어 각 군 당 4마리씩 배정하였다. 사육은 인공적으로 온도와 습도, 광량이 조절되는 사육실에서 하였으며 물과 사료는 자유급식 하였다. 토끼는 가로 120 cm, 세로 180 cm 크기의 케이지에서 4마리씩 사육하였으며 자유운동을 하도록 하였다.

실험 방법

관절염 유발법 – 전십자 인대 절제술로 관절염 유발을 유도하였다.²⁷⁾ atropine을 0.02 mg/kg 피하주사 한 후 5분 뒤 xylazine hydrochloride를 3 mg/kg 근육주사 하고 5분 뒤 ketamine hydrochloride 50 mg/kg을 근육주사 하여 마취시킨 후 오른쪽 다리를 제모하고 10% 포비돈-요오드액과 알콜로 소독한 후 무릎관절 내측의 피부를 절개하고 근막과 관절낭을 절개하여 십자인대를 노출시켰다. 11호 블레이드로 전십자 인대를 절제한 후 멸균생리식염수로 관절내를 세척한 후 4-0 흡수성 봉합사로 관절낭과 근막을 단속봉합하고 피부는 3-0 비흡수성 봉합사로 단속봉합하였다. 피부를 10% 포비돈-요오드액으로 소독한 후 포대를 하였다. 술 후 일주일동안 enrofloxacin(Bytril®, Bayer Korea LTD., Korea) 5 mg/kg 를 피하주사 하고 피부를 소독해주었다.

투여 방법 – 모든 물질은 경구 투여하였다. Control은 생리식염수를 0.5 ml/kg 투여하였고, LVA 투여군과 AC군은 각각의 용량에 맞추어 투여하였다. LVA는 in vitro 실험에서 type II collagen의 발현도가 가장 높은 LVA를 사용하였다. 모든 군은 수술 후 다음날부터 6주째 되는 날까지 매일 한번 투여하였다.

검사 방법 – 수술 후 6주째 모든 토끼를 xylazine hydrochloride와 ketamine hydrochloride로 마취시킨 후 thiopental sodium을 과다 투여하여 안락사 시킨 후 오른쪽 무릎 관절부의 직경을 측정한 후 절개하여 관절면을 조심스럽게 노출시켰다. 관절액의 양 및 상태, 대퇴골과 경골의 내측 및 외측 관절면 그리고 관절낭을 관찰하여 변화를 기록하였다. 대퇴골의 연골표면 변화는 대퇴부 관절 내·외측

에서 연골 결손부의 깊이를 인디안 잉크를 도포하여 1에서 4의 네 단계로 나누어 점수를 부과하였다.²¹⁾ 1은 관절면이 정상으로 보이며 잉크가 묻지 않는 상태를 나타내며, 2는 외관상 정상으로 보이나 잉크 도포 시 연희색의 반점형태로 묻는 것을 나타낸다. 3은 관절면이 우둘투둘하며 잉크 도포 시 진한 검은 반점이 형성되는 것이며, 4는 연골하골이 드러난 것을 나타낸다(Table I).

결 과

In vitro study

LVA에 의한 Collagen type II 발현도 – Western blotting 결과 무처리군인 control군 보다 LVA처리군의 collagen type II의 발현도가 상승한 것을 알 수 있었다. LVA의 점도별로 비교하여 보면 LVA1이 0.95, LVA2가 1.41, LVA3이 1.57, LVA4가 1.58로 LVA4의 제 2형 콜라겐 발현도가 가장 높게 나왔다(Fig. 1). 가장 결과가 좋은 LVA4를 이용한 농도별 실험에서는 50, 100, 200 µg/ml 처리 시 각각 1.24, 1.52, 1.86으로 모두 control에 비하여 collagen type II의 발현도가 농도 의존적으로 상승하였으며 200 µg/ml에서 가장 높은 발현도를 보였다(Fig. 2).

In vivo study

육안적 검사 결과 – 수술하지 않은 정상 관절은 수술한

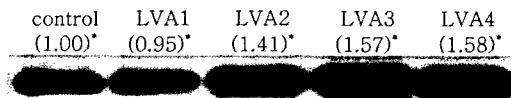


Fig. 1. Effect of various viscosity of LVA on type II collagen expression in articular chondrocytes.

*: Size of bands

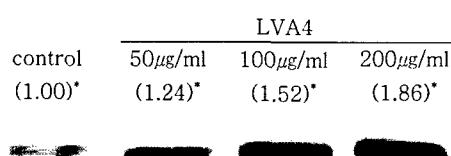


Fig. 2. Effect of various concentration of LVA4 on type II collagen expression in articular chondrocytes.

*: Size of bands

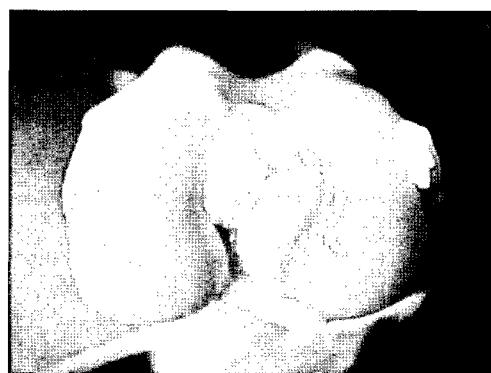


Fig. 3. Gross evaluation of normal cartilage surface of femoral condyle.

쪽 다리와 비교하여 부종이 없고 관절낭의 절개 시 무색투명한 활액이 스며나오지만 양이 많지는 않았고 약간의 점성을 가졌다. 관절면은 매끈하고 반투명하며 수술한 쪽 다리의 관절면보다 연골의 층이 얕게 보였다(Fig. 3).

오른쪽 관절을 조심스럽게 절개하여 관찰한 결과 관절낭액의 양과 점도는 정상관절의 관절낭액이 무색투명하고 약간의 점성을 가진데 비하여 전십자인대 절제술을 실시한 관절의 관절낭액은 정상에 비해 관절낭액의 양과 점도가 다소 증가하였으며 투명한 황갈색을 띠었지만 군 간에 유의적인 차이를 판별할 수는 없었다. 관절낭을 포함한 관절주변 조직은 수술하지 않은 쪽 다리에 비하여 부종이 심하였고 연골 주위에 osteophyte의 형성이 관찰되었다.

관절면의 육안적 검사 결과 A12.5군은 점수가 4.00 ± 0.00 으로 control군의 점수인 3.88 ± 0.35 와 유사한 수치를 보였다. A25군은 2.88 ± 0.83 , A50군은 2.13 ± 0.83 , A75군은 2.00 ± 1.07 의 점수를 나타내어 LVA의 용량 의존적으로 관절염의 점수가 낮아졌으며 A25군, A50군, A75군은 대조군에 비하여 유의한 점수차를 보였다. 반면, AC군은 3.88 ± 0.35 로 control군과 차이를 보이지 않았다(Table II)(Fig. 4).

Table II. Gross evaluation of the cartilage surface of femoral condyle

	Femoral condyle		Average
	Lateral	Median	
Control	3.75 ± 0.50	4.00 ± 0.00	3.88 ± 0.35
A12.5	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
A25	3.00 ± 0.82	2.75 ± 0.96	$2.88 \pm 0.83^*$
A50	2.75 ± 0.50	1.50 ± 0.58	$2.13 \pm 0.83^{**}$
A75	2.00 ± 0.82	2.00 ± 1.41	$2.00 \pm 1.07^{**}$
AC	4.00 ± 0.00	3.75 ± 0.50	3.88 ± 0.35

* $p < 0.05$:significantly different from control value.

** $p < 0.02$:significantly different from control value.

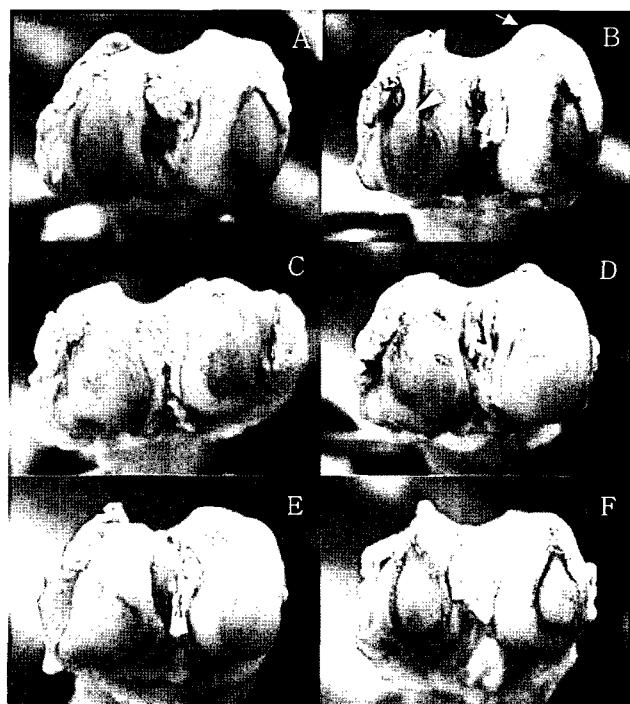


Fig. 4. Gross evaluation of the cartilage surface of femoral condyle. Osteophytes (arrow) and subchondral bone (arrowhead) are observed in the femoral condyle.

- A:femoral condyle of control group
- B:femoral condyle of A12.5 group
- C:femoral condyle of A25 group
- D:femoral condyle of A50 group
- E:femoral condyle of A75 group
- F:femoral condyle of AC group

고 찰

관절연골은 대부분이 수분으로 구성되어 있고 proteoglycan이 5~10%, 제 2형 콜라겐이 10~20%, proteoglycan과 제 2형 콜라겐과 같은 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)을 생산하는 연골세포가 1~5%를 차지한다. 제 2형 콜라겐은 연골 내에서 그물형 뼈대를 형성하여 연골의 틀을 이루며, proteoglycan은 음전하를 띠고 있어서 수분을 담고 있는 역할을 한다. 연골세포는 연골의 정상적인 구조와 기능을 유지하는 역할을 하며, 산소와 영양분은 활액 또는 연골하골의 혈관을 통해서 공급을 받는다. 정상적인 연골세포는 증식과 대사적 활성 즉 ECM의 합성이나 분해 등은 매우 느리게 일어나지만 항상성을 유지하여 연골조직의 붕괴를 막는다. 그러나 어떠한 요인에 의해 그 항상성이 깨어지면 ECM의 생산이 억제되고 세포외 기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases(MMP)가 다량 분비되어 연골조직의 붕괴를 일으켜 관절염의 증상을 나타내게 된다. 이러한 연골붕괴의 과정에서 IL-1 β , TNF α 와 같은 염증성 사이토

카인은 연골세포에 직접 작용하여 염증매개체인 cyclooxygenase-2(COX-2)를 합성하여 prostaglandine E2(PGE2)를 생성하게 되고, 유리된 PGE2는 관절낭에서 염증 및 통증을 유발하게 된다.

제 2형 콜라겐은 연골에만 있는 특이적인 고분자로 관절 연골의 물리적 특성을 나타낸다. 관절연골에 가해지는 압력에 대항하여 연골의 형태를 유지하며, proteoglycan의 분자사슬이 콜라겐 섬유 사이에 걸쳐져서 이탈을 방지하고 수분을 흡수하여 탄성을 유지하도록 한다. 제 2형 콜라겐은 골관절염의 상태에서 superficial과 upper middle zone에서 가장 먼저 감퇴된다.^{22,23)} Hollander 등은 superficial zone에서 제 2형 콜라겐의 감퇴와 proteoglycan의 탈염색화가 동시에 일어남을 관찰하였다.²⁴⁾ 이는 골관절염시 연골의 가장 표층부에 있는 제 2형 콜라겐이 물리력이나 효소 등에 의해 소실되면 콜라겐 섬유망에 걸쳐있는 proteoglycan도 활액으로 유리되어 벼린다는 것을 유추해 볼 수 있다. 또한, Shingleton 등은 proteoglycan에 비하여 제 2형 콜라겐이 연골에서 합성과 분해의 주기가 길어서 한번 파괴되면 재생이 힘들기 때문에 콜라겐을 보호하는 것이 연골의 치유에 있어서 중요하다고 보고한 바가 있다.¹⁵⁾

이러한 연구에 차안하여 LVA의 제 2형 콜라겐 합성능을 western blot 방법을 통하여 실험한 결과, LVA1이 0.95, LVA2가 1.41, LVA3이 1.57, LVA4가 1.58로 LVA의 점도가 낮을 수록, 즉 LVA의 분자량이 작을 수록 밴드의 크기가 커으며, LVA4를 이용한 농도별 실험에서는 50, 100, 200 µg/ml 처리시 각각 1.24, 1.52, 1.86으로 LVA의 농도에 따라 밴드의 크기도 증가하여 LVA를 처리하지 않은 대조군에 비하여 연골세포의 콜라겐 합성능이 증가하였다. 그러나 LVA1이 0.95로 control보다 밴드의 크기가 0.05 적은 것으로 보아 알긴산 원료 자체만으로는 연골세포에서 제 2형 콜라겐의 합성을 촉진시킬 수 없다는 것을 알 수 있었으며, 고분자 알긴산을 유기산으로 분해하여 저분자화 할수록 밴드의 크기가 커지는 것으로 보아 연골세포에서 제 2형 콜라겐 합성을 촉진하는 특정 저분자대가 있다는 것을 유추해 볼 수 있다. 차후, 이러한 저분자대에 대한 연구와 IL-1 β 로 염증을 유발한 연골세포에서의 콜라겐 합성능과 다른 인자들(proteoglycan, COX-2, MMPs 등)에 대한 추가 연구가 필요하지만, 제 2형 콜라겐의 생성을 촉진하는 천연물에 대하여 밝혀진 보고가 없는 바, 매우 고무적인 결과라고 할 수 있겠다.

관절염과 관련된 약제들의 동물실험을 위해 실험적으로 관절염을 유발하는 동물모델은 다양한 종류가 있다. 효소나 면역반응을 이용한 관절염 유발 동물모델은 사람의 류마티스 관절염과 유사한 병태를 나타내어 collagenase, collagen type II 등이 류마티스 관절염 실험 모델을 만드는데 많이 쓰인다.^{25,26)} 골관절염 실험 모델은 주로 수술적인 방법으로 관절의 불안정성을 야기하여 연골의 파괴와 osteophyte의 형

성을 유발하는 방법으로 전십자인대, 곁인대의 절제, 반달 연골 제거 등의 방법이 있다.²⁷⁻²⁹⁾ 무릎관절 안에 있는 십자인대는 전십자인대와 후십자인대로 나뉘며 전십자인대가 손상되면 경골쪽 관절면이 앞쪽으로 밀리는 것을 막을 수 없게 되어 골관절염이 유발된다. 십자인대 손상과 골관절염에 대한 연구에서 무릎 골관절염은 전십자 인대 손상이 없는 사람보다 전십자 인대 파열이 있는 사람에서 훨씬 심한 것으로 평가되었다. 이러한 추적 결과로 전십자 인대의 완전파열은 무릎 골관절염으로의 진행에 중요한 역할을 한다고 하였다.³⁰⁾ 본 실험에서도 토끼의 전십자 인대를 절제하여 골관절염을 유발하는 방법을 선택하였으며, 병변을 확실히 유발하기 위해 넓은 케이지에서 자유 운동을 할 수 있도록 하였다.

현재 시판되는 관절염 약제들은 대부분이 비스테로이드 성 항염증제, 즉 NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs) 계열의 약이며 이러한 약들은 염증매개체인 COX-2를 억제함으로써 관절의 염증과 통증을 억제하는 작용을 한다. 최근에는 위장관계에 부작용이 적은 COX-2 선택적 억제제들이 개발되었지만 심혈관계 부작용 유발의 가능성이 문제시 되고 있다. 본 동물 실험에서 사용한 aceclofenac은 NSAIDs계열 약으로 국내에서 초기 골관절염의 통증을 호소하는 환자에게 많이 처방되는 약이다. 실험 결과, aceclofenac은 control군에 비하여 육안적인 관절 병변이 전혀 호전되지 못한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 aceclofenac이 관절의 염증과 통증을 완화시켜줄 뿐이지 연골의 파괴에 대한 억제나 치료작용은 없는 것으로 보인다. 또한, 관절의 통증이 완화된 AC군의 실험 동물이 수술한 쪽 다리에 체중을 더 싣거나 다른 군보다 더 많이 움직이게 되어 연골의 깎임이 호전되지 않았을 가능성도 있다. 반면에 LVA 투여군은 A25, A50, A75군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 관절의 파괴가 억제 되었고, A75군에서 가장 좋은 결과를 보여주었다. 이상의 결과로 유추해 볼 때, LVA는 구강으로 섭취되어 장에서 흡수, 혈액을 통해 관절 까지 간 후 연골세포에 자극을 줘서 연골세포에서 제 2형 콜라겐의 생성을 촉진시켰고 결과적으로 연골의 파괴를 억제했다고 생각해 볼 수 있다. 전십자인대를 절제한 동물 모델에서의 골관절염 병태는 사람의 일반적인 골관절염에 비하여 매우 급속히 진행되기 때문에 실험 토끼에게 LVA를 투여하여 제 2형 콜라겐의 생성이 촉진되었다고 하더라도 세포외 기질이 분해되는 속도를 넘어설 수가 없다. 그렇기 때문에, 본 실험의 결과처럼 대조군에 비하여 LVA 투여군이 연골의 깎임이 매우 덜 하지만, 골관절염이 완전히 치유된 결과를 보여주지는 못한 것 같다. 반면, 사람의 골관절염은 진행이 매우 더디기 때문에 장기적인 LVA의 섭취 시 임상적으로 유효한 치료 효과를 나타낼 가능성을 유추해 볼 수 있겠다.

결 론

알긴산을 점도별로 만든 LVA1, LVA2, LVA3, LVA4의 연골세포에 대한 제 2형 콜라겐 발현도를 비교해 본 결과 점도가 9.6 cP인 LVA4의 발현도가 1.58로 가장 높았으며, LVA4를 50, 100, 200 µg/ml로 연골세포에 처리한 결과 대조군의 1.00에 비하여 제 2형 콜라겐의 발현도가 50, 100, 200 µg/ml 처리 시 각각 1.24, 1.52, 1.86으로 증가하였다. 전십자인대 절제술로 골관절염을 유발한 토끼 실험에서는 A25, A50, A75군이 대조군과 비교하여 유의적으로 관절연골의 파괴를 보호하는 효과를 보였고 NSAIDs계열 약인 aceclofenac 투여군은 대조군과 비슷한 값을 나타내어 연골의 깎임을 보호하는 효과는 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 LVA는 연골세포의 제 2형 콜라겐 생성을 촉진시켜 연골 보호 및 치료 효과를 보인다는 것을 알 수 있었다.

인용문헌

1. Howell, D. S. (1984) Pathogenesis of osteoarthritis. In Moskowitz, R. W. et al (ed.), *Osteoarthritis, diagnosis and management*, 129-146. Saunders company, Philadelphia, WB.
2. Reginster, J. Y. (2002) The prevalence and burden of osteoarthritis. *Rheumatology* **41**: 3-6.
3. Hardingham, T. E., Fosang, A. J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* **6**: 861-870.
4. Prockop, D. J. (1998) What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol* **16**: 519-528.
5. Brandt, K. D. (1993) Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs be used to treat osteoarthritis?. *Rheum Dis Clin North Am* **19**: 29-44.
6. Niethard, F. U. (1999) Pathogenesis of osteoarthritis-approaches to specific therapy. *Am J Orthop* **28**: 8-10.
7. Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., Sing, G (1999) Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *N Engl J Med* **340**: 1888-1899.
8. Mukherjee, D., Nissen, S. E., Topol, E. J. (2001) Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *J Am Med Assoc* **286**: 954-959.
9. Solomon, D. H., Schneeweiss, S., Glynn, R. J., Kiyota, Y., Levin, R., Mogun, H., Avorn, J. (2004) Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* **109**: 2068-2073.
10. Bucci, L. R. (1994). Chondroprotective agents. Glucosamine salts and chondroitin sulfates. *Townsend Letter for Doctors* **1**: 52-54.
11. Kajimoto, O., Sakamoto, K., Takamori, Y., Kajitani, N., Imanishi, T., Matsuo, R., Kajitani, Y. (1998) Therapeutic activity of oral glucosamine hydrochloride in osteoarthritis of the knee. A placebo-controlled, double-blind, cross-over study. *Japanese Journal of Clinical Nutrition* **20**: 41-47.
12. Cardarelli, L., Brun, P., Bernardi, D., and Abatangelo, G (1995) The scavenger effect of hyaluronan in synovial fluid. *Wound Repair Regen* **3**: 76.
13. Delafuente, J. C. (2000) Glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **26**: 1-11.
14. Towheed, T. E., Anastassiades, T. P. (1999) Glucosamine therapy for osteoarthritis. *J Rheumatol* **26**: 2294-2297.
15. Shingleton, W. D., Hodges, D. J., Brick, P., Cawston, T. E. (1996) Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol* **74**: 759-775.
16. Fukumoto, T., Sperling, J. W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J. S., Reinholtz, G. G., Conover, C. A., O'Driscoll, S. W. (2003) Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-β1 on periostealmesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cart* **11**: 55-64.
17. Qi, W. N., Scully, S. P. (1998) Effect of type II collagen on chondrocyte response to TGF-β1 regulation. *Exp Cell Res* **241**: 142-150.
18. Venter, C. S., Vorster, H. H., Van Der Nest, D. G. (1990) Composition between physiological effects of konjac-glucoromanan and propionate in baboons fed "western" diets. *J Nutr* **120**: 1046-1053.
19. Suzuki, T., Nakai, K., Yoshie, Y., Shirai, T., Hirano, T. (1993) Effects of sodium alginates rich in guluronic and mannuronic acids on cholesterol levels and digestive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**: 545-551.
20. Masuda, K., Sah, R. L., Hejna, M. J., Thonar, E. J. (2003) A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: The alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res* **21**: 139-148.
21. Yoshioka, M., Coutts, R. D., Amiel, D., Hacker, S. A. (1996) Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis and Cart* **4**: 87-98.
22. Dodge, G. R., Poole, A. R. (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* **83**: 647-661.
23. Hollander, A. P., Pidoux, I., Reiner, A., Roraec, C., Bourne, R., Poole, A. R. (1995) Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* **96**: 2859-2869.
24. Moskowitz, R. W., Davis, W., Sammarco, J., Martens, M., Baker, J., Mayor, M., et al. (1973) Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* **16**: 397-405.
25. Lindqvist, A. B., Bockermann, R., Johansson, A. C., Nan-

- dakumar, K. S., Johannesson, M., Holmdahl, R. (2002) Mouse models for rheumatoid arthritis. *Trends Genet* **18**: 7-13.
26. Kannan, K., Ortmann, R. A., Kimpel, D. (2005) Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**: 167-181.
27. Hashimoto, S., Achermann, L. C., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R. D., Lotz, M. (2002) Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cart* **10**: 180-187.
28. Rogart, J. N., Barrach, H. J., Chichester, C. O. (1999) Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cart* **7**: 539-547.
29. Kobayashi, K., Amiel, M., Harwood, F. L., Healey, R. M., Sonoda, M., Moriya, H., Amiel, D. (2000) The long-term effects of hyaluronan during development of osteoarthritis following partial meniscectomy in a rabbit model. *Osteoarthritis Cart* **8**: 359-365.
30. Hill, C. L., Seo, G. S., Gale, D., Totterman, S., Gale, M. E., Felson, D. T. (2005) Hyaluronan oligosaccharide-induced activation of transcription factors in bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **52**: 794-799.

(2007년 2월 8일 접수)