

Monosodium iodoacetate로 유도된 골관절염 동물모델에서 상기생 물추출물의 효과

김중선^{1#}, 이아영¹, 문병철¹, 김효선¹, 김욱진¹, 김철², 최고야¹, 김승형³, 천진미^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한약연구부, 2 : 한국한의학연구원 미래의학부, 3 : 대전대학교 동서생명과학연구원

Effects of aqueous extract from *Taxillus chinensis* on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats

Joong Sun Kim^{1#}, A Yeong Lee¹, Byeong Cheol Moon¹, Hyo Seon Kim¹
Wook Jin Kim¹, Chul Kim², Goya Choi¹, Seung-Hyung Kim³, Jin Mi Chun^{1*}

1 : Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea
2 : Future Medicine Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea
3 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 34520, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate the protective effects of an aqueous extract from *Taxillus chinensis* (DC.) Danser (TCE) in Monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis (OA) rat model.

Methods : Sprague Dawley male rats were divided into the following four groups (n=6 per group): Normal (saline control), MIA (MIA-induced OA with vehicle), TCE (MIA-induced with TCE treatment), and IM (MIA-induced with indomethacin treatment). Rats in which OA was induced by MIA were treated with TCE (200 mg/kg) or indomethacin (1 mg/kg) for 4 weeks. Weight-bearing on the hind legs and body weights were measured weekly. At the end of the experiment (3 weeks after MIA injection), serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels were measured to assess the liver toxicity induced by TCE. Its effects on serum inflammatory cytokine levels and tissue histopathology were also evaluated.

Results : TCE restored the hind limb weight-bearing distribution. Serum levels of Interleukin 6 (IL-6), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Leukotriene B4 (LTB4) were significantly higher in the MIA group than in the Normal group, but serum IL-6 levels were significantly lower in the TCE group. In the TCE group, the synovial membrane was protected in hematoxylin and eosin and Safranin-O staining, respectively.

Conclusions : TCE recovered the hind paw weight bearing distribution, inhibited the production of inflammatory cytokine, and protected synovial tissue and cartilage in the OA rat model. Therefore, TCE appears to be an effective therapeutic agent for treating OA and OA-related symptoms.

Key words : *Taxillus chinensis*, osteoarthritis, monosodium iodoacetate, rat, inflammatory cytokine

I. 서 론

골관절염은 활액의 염증, 연골퇴화, 그리고 뼈의 경화를 특징

으로 하는 근골격계 질환이며¹⁾, 유전, 노화, 관절 손상, 비만, 연골 이상, 염증성 효소의 과도한 분비 등 다양한 요인들이 관여한다²⁾. 골관절염은 연골의 소실과 뼈의 손상으로 오는 염증

*Corresponding author : Jin Mi Chun, Herbal Medicine Research Division, Daejeon 34054, Korea Institute of Oriental Medicine.
· Tel : +82-42-868-9507 · E-mail : jmchun@kiom.re.kr

#First author : Joong Sun Kim, Herbal Medicine Research Division, Daejeon 34054, Korea Institute of Oriental Medicine.
· Tel : +82-42-868-9537 · E-mail : centraline@kiom.re.kr

· Received : 19 July 2018 · Revised : 16 August 2018 · Accepted : 25 September 2018

과정에서 더욱 악화되며, 통증으로 인한 운동장애는 근육 손실로 이어져 더욱 문제를 야기시킨다³⁾.

골관절염은 전 세계적으로 노인에게서 유병률이 높은 질환이며, 국민건강영양조사 자료를 바탕으로 우리나라 50세 이상 성인의 골관절염 유병률은 연령이 증가할수록 높은 것으로 나타났고, 앞으로도 유병률은 증가할 것으로 예측된다^{4,5)}.

골관절염에 대한 치료는 운동을 포함한 물리적 요법 등을 포함하여 혈액학적, 면역학적, 동태학적 및 조직학적으로 접근하고 있으며, 이러한 치료를 통해 연골세포의 재생 및 연골 보호, 통증 및 관절 운동 개선 등의 효과가 있다고 보고되었다⁶⁾. 현재 골관절염의 치료는 증상 개선에 중점을 두며, 약물의 경우 나프록센(Naproxen), 이부프로펜(Ibuprofen)과 같은 비스테로이드성 진통소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 뿐만 아니라 paracetamol (Acetaminophen)을 포함한 다양한 스테로이드제가 사용되고 있지만, 중독 및 기타 부작용으로 인해 문제점이 야기되고 있다⁷⁾. 약물 및 운동 요법의 치료에도 불구하고 질병의 개선이 이루어지지 않으면 인공관절을 비롯한 수술적 치료법이 제안된다. 골관절염의 치료에는 한약재를 포함한 다양한 한방 치료가 효과적인 치료법으로 알려져 있다⁸⁾.

한의학적으로 골관절염은 관절비증(關節痺證)에 해당하는 질환 중의 하나로서, 근골의 관절 등의 동통(疼痛), 관절종창 등으로 운동장애 및 감각이상을 나타내는 병증으로 보고 있다. 비증(痺證)은 풍(風), 한(寒), 습(濕)과 같은 사기(邪氣)가 인체표면과 경락에 침범하여 기혈운행이 순조롭지 못하여 지체, 근육, 관절 등에 동통, 산초, 마목, 종창, 종창, 굴신불리와 관절종창 등의 증상이 나타나는 것을 말한다⁹⁾.

상기생(桑寄生)의 한의학적 통합 정보를 살펴보기 위해 오아시스(OASIS) 전통의학정보포털 내 K-herb network

(<https://oasis.kiom.re.kr/kmedi/main.jsp>)를 이용하여 분석해 본 결과, 한의학적 효능은 安胎元, 祛風濕, 補肝腎, 强筋骨으로 風濕痺痛, 筋骨無力, 腰膝酸軟 등을 치료하는 약재로 알려져 있다(Fig. 1).

상기생의 기원식물은 겨우살이과(Loranthaceae)의 뽕나무 겨우살이 *Scurrula parasitica* L.(이명, *Loranthus parasticus* Merr.) 또는 광기생(廣寄生) *Taxillus chinensis* (DC.) Danser(이명, 상기생)의 잎, 줄기 및 가지로 대한민국 약전외한약(생약)규격집(KHP)에 수재되어 있으나^{10,11)}, 중국 약전과 대만중약전에서는 기원식물을 *T. chinensis*만으로 규정하고 있다¹²⁾. 박 등의 연구¹¹⁾에 따르면 대한민국약전 및 대한민국약전외한약(생약)규격집 수재 한약재 현황 검토결과 학명에 대한 정정이 필요한 품목 중의 하나로서 이에 대한 보완이 필요하다고 보고되었다. 따라서 상기생 기원식물의 정명 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser [= *Loranthus chinensis* DC.]¹²⁾에 근거하여 조사된 효능 관련 기존 연구에서는 상기생 추출물의 알코올에 의한 골대사장애 및 골다공증에 대한 예방 효과¹³⁾, 파골세포와 관련된 주요 전사인자 발현을 저해하여 파골세포 분화 및 골 흡수 억제를 통한 파골세포 관련 골질환의 예방 효과¹⁴⁾, 상기생에서 분리된 polysaccharides의 항산화 및 항염증 효과¹⁵⁾ 등이 보고되었다.

위와 같이 한의학적 효능 및 기존 연구보고를 토대로 상기생은 골질환 관련 치료 후보 물질로서의 가능성을 제시하고 있으므로, 이에 대한 골관절염 효과 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 monosodium iodoacetate (MIA) 유도에 의한 골관절염 동물모델을 이용하여 체중 및 뒷다리 체중부하 측정 추이관찰, 혈청 내 염증관련 인자, 관절 내부 조직병리학적 변화를 통해 상기생 추출물의 골관절염 개선 효과를 확인하고자 하였다.



Figure 1. Main target and efficacy in Traditional Korean Medicine correlation network of *Taxillus chinensis* using Oriental Medicine Advanced Searching Integrated System (OASIS).

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시료동정

상기생은 중국 남부와 동남아시아 지역에 주로 분포하는 것으로 알려져 있어¹⁶⁾ 중국산 유통품으로 광명당제약(울산, 한국)을 통해 구입하였다. 본 연구에서 사용한 상기생 시료는 한국한의학연구원의 최교야 박사가 1차적으로 형태감별을 수행하였으며, 2차적으로 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 각 시료의 종을 동정하였다. 연구에 이용한 상기생 유통품의 기원 검증은 기 보고된 문 등¹⁷⁾의 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 한약재 정력자 유통품의 종을 동정한 방법을 이용하였다. 한국한의학연구원 한약표준표본관(Index herbariorum code KIOM)에 수장된 광기생(*T. chinensis*)과 국내에 자생하는 겨우살이류인 겨우살이(*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai), 꼬리겨우살이(*Loranthus tanakae* Franch. & Sav.), 동백나무겨우살이(*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.), 참나무겨우살이(*Taxillus sutchuenensis* var. *duclouxii* (Lecomte) H.S.Kiu)와 상기생 유통품으로부터 *matK* 유전자를 증폭하고 이들 염기서열의 비교·분석을 통해 대한민국약전 기원종인 광기생과 동일한 염기서열 정보를 갖는 시료를 선별하여 추출물을 제조하여 사용하였고, 상기생의 표본은 한국한의학연구원 한약표준표본관에 보관하였다(KIOM 2-16-0420).

2. 추출물 제조

추출물 제조를 위해 상기생(999.03 g)을 잘게 절단하여 증류수 7 L를 넣고 환류추출기에서 100°C, 2 시간씩 3번 환류 추출한 후 추출액을 거르고 회전증발기로 용매를 농축한 후 동결건조기를 이용하여 물 추출물(107.29 g)을 제조하였다(수득율 10.74%, w/w).

3. High-performance liquid chromatography 분석

이화학적 분석은 High-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하였으며, 기존 문헌 검색을 통하여 구성성분을 검색하였다. HPLC 분석을 위하여 사용한 물과 아세토니트릴은 모두 HPLC급을 사용하였으며 표준품으로 catechin (≥98.0%)은 Shanghai Sunny Biotech (Shanghai, China), quercitrin (≥98.0%)은 ChemFaces (Wuhan, China)에서 구입하여 사용하였다.

상기생 물추출물 101.6 mg을 증류수 5 mL에 녹인 후 syringe filter 후 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC 분석을 위하여 Waters e 2695 Separation module과 2998 PDA detector가 결합된 Waters Alliance 장비(Waters Corporation, MA, USA)를 사용하였고 분석용 컬럼은 SunFire C18 (5µm, 4.6 × 250 mm, Waters Corporation, MA, USA)을 사용하였다. 유속은 0.8 mL/min, 용매 주입량은 10 µL, 검출기의 분석파장은 200~400 nm에서 설정 한 후, catechin은 278 nm, quercitrin은 254 nm에서 검출하였다. 분석용매는 0.05% formic acid

in Water (A), acetonitrile (B)을 사용하여 0~40분까지 5%~50% acetonitrile로 linear gradient 조건에서 분석하였다.

4. 실험동물

실험동물은 수컷 Sprague Dawley (SD) rat(7주령, 185~230 g)를 샘타코바이오키리아(주)(오산, 한국)에서 구입하여 사용하였고, 일주간 적응기를 거친 후 실험 당일까지 물은 자유 급수와 일반 고형사료를 충분히 공급하고, 습도 55 ± 15%, 온도 22 ± 2, 12시간(light-dark cycle) 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인 번호: DJUARB 2016-019).

5. MIA에 의한 골관절염 유발

본 연구에서는 MIA (monosodium iodoacetate, Sigma-Aldrich, Germany)를 관절 내에 주사하여 골관절염을 유발하였다. 이를 위해 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA를 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 µL (60 mg/mL) 씩 투여하였고, MIA 용액 제조시 0.9% saline을 사용하였다⁹⁾.

6. 실험군 분류 및 약물 투여

실험군은 정상군(Normal), 골관절염 유발군(MIA), 골관절염 유발군에 상기생 추출물 투여군(MIA+TCE, 200 mg/kg)과 골관절염 유발군에 인도메타신 투여군(MIA+IM, 1 mg/kg) 총 4군(n=6 per group)으로 나누어 실험하였으며, 약물처리군(TCE, IM)은 관절염 유발 1주전부터 총 4주간 매일 경구 투여하였다. 본 실험에 사용된 인도메타신(indometacin, Sigma-Aldrich, Germany)은 기존 연구결과를 토대로 급성관절염에 소염진통제로 사용되어 양성대조군으로 사용하였다¹⁸⁾.

7. 체중 및 뒷다리 체중 부하 측정

모든 실험군은 실험 개시일 부터 4주간 주 1회 체중 측정을 하였고, 뒷다리 체중 부하 측정은 MIA 유도 후 주 1회 Incapacitance tester (Linton Instrumentation, UK)를 이용하여 측정하여 각 뒷다리에 가해진 세기를 3초 이상 관찰 후 평균을 산출하였으며, 뒷다리에 분포된 체중의 백분율은 기존에 보고된 방식과 동일한 다음의 식을 통해 산출하였다: [오른쪽 뒷다리 체중 / (오른쪽 뒷다리 체중+왼쪽 뒷다리 체중)] × 100¹⁹⁾.

8. 혈액생화학적 검사

최종 실험 종료 후 간독성 여부를 평가하기 위한 혈액생화학적 검사를 위해 심장에서 채혈 한 혈액에서 분리된 혈청으로부터 간 독성 지표효소인 aspartate transaminase (AST)와 alanine transaminase (ALT)를 생화학자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

9. 혈청 내 염증 cytokine 및 염증 매개 인자 측정

분리된 혈청에서 염증 사이토카인 및 염증 매개인자인 Interleukin- 1β (IL- 1β), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Leukotriene B4 (LTB4) 를 ELISA 측정 키트(R&D System, USA)를 이용하여 생성량의 변화를 측정하였다.

10. 조직병리학적 검사

무릎 부위를 절단하여, 10% EDTA가 포함된 10% 포르말린 용액에 넣어 관절 조직을 탈칼슘화 시켰다. 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정한 다음 coronal section을 실시하였다. 탈칼슘화 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 자른 뒤, Hematoxylin and Eosin (H&E) 및 Safranin-O 염색을 실시하여 100배의 비율로 조직 상태를 관찰하였다.

11. 통계분석

본 연구의 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, USA)를 사용하여 One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's Multiple Comparison Test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

III. 결 과

1. 성분분석

형태감별 및 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 선별된 시료를 이용하여 추출물을 제조하였고, 이화학적 성분분석을 위해 HPLC 성분분석을 실시한 결과 15.6분대에서 catechin이 $3.067 \pm 0.055 \mu\text{g}/\text{mg}$ 이 검출되었고, 25.5분대에서 quercitrin이 $0.108 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{mg}$ 검출되었다(Fig. 2A-2D).

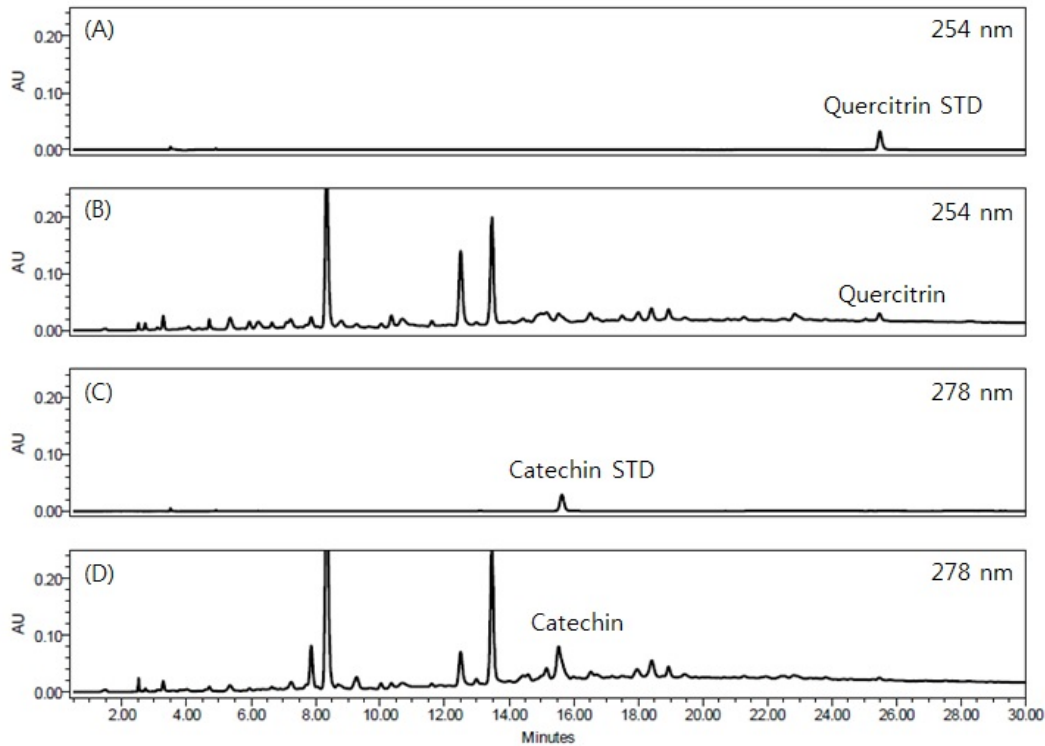


Figure 2. HPLC chromatogram of quercitrin standard (A) at 254 nm, aqueous extract of *T. chinensis* (TCE) (B) at 254 nm, catechin standard (C) at 278 nm, and TCE (D) at 278 nm, respectively.

2. 체중 변화 및 간독성 평가

실험 전 기간 동안 대조군을 포함한 모든 실험군에서 사망 동물은 관찰되지 않았으며, 군 분리를 위한 시험 개시 전 체중 측정 후 부검 전까지 매주 체중을 측정된 결과 모든 군에서 고른 체중 증가가 관찰되었으며 대조군을 포함한 모든 실험군 간의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3A). 또한, 상기생 추출물의 섭취에 따른 간 기능의 영향에 대해 알아보기 위해 혈액 내 AST, ALT 측정 결과, 모든 실험군에서 통계적으로 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 이를 통해 골관절염 동물모델에서 4주

동안 투여된 상기생 추출물 200 mg/kg/day 용량 수준에서 일반 독성 및 간독성은 관찰되지 않았다(Fig. 3B).

3. 뒷다리 체중 부하 측정 결과

뒷다리 체중 부하(weight bearing distribution ratio) 측정 결과 MIA 투여 후 7일과 14일에 행동학적으로 이상소견이 관찰되었으며 이러한 결과는 MIA 유도군의 경우 21일까지 지속되었다. 상기생 추출물 및 인도메타신 투여군(TCE, IM)의 경우에는 MIA 유도 후 7일과 14일까지 MIA 유도군과 유사

하게 뒷다리 체중 부하가 감소되었으나, 21일 경과시점에서 MIA 유도군에 비해 유의성 있게 증가함으로써 골관절염 증상이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

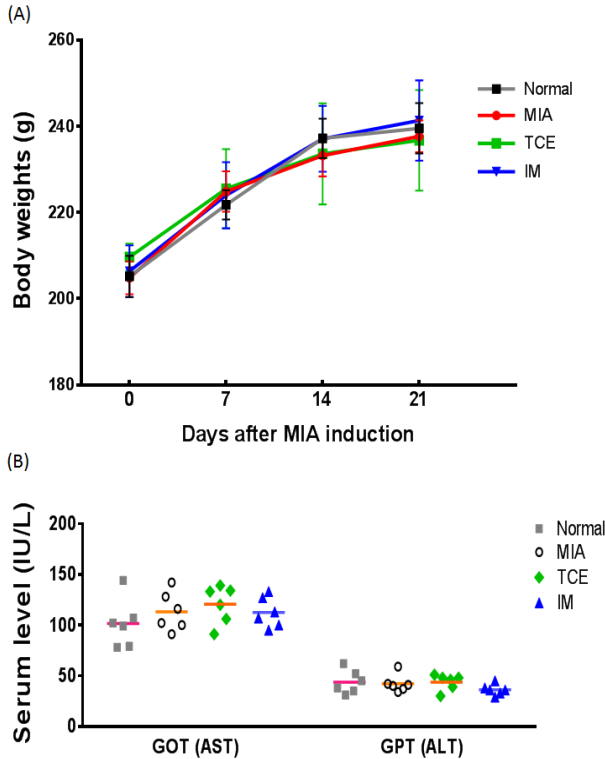


Figure 3. Effects of TCE on changes in body weights (A) and serum levels of AST, ALT, (B) in MIA-induced osteoarthritis (OA) rats. Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n = 6).

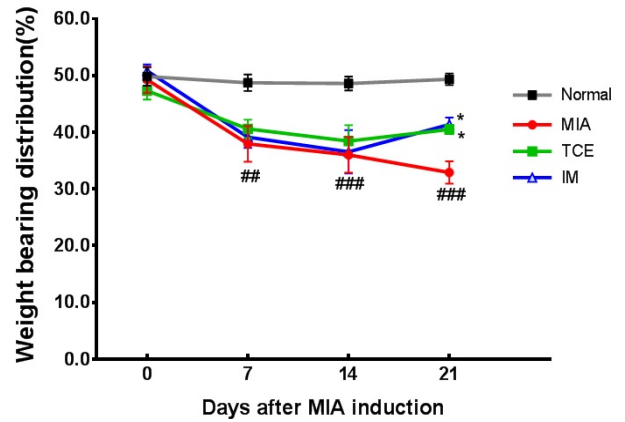


Figure 4. Effects of TCE on changes in hindpaw weight bearing distribution in MIA-induced OA rats. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 6). ## p < 0.01 and ### p < 0.001 versus Normal; * p < 0.05 versus MIA.

4. 혈청 내 염증성 인자 결과

혈청 내 염증성 사이토카인 및 매개인자인 Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Leukotriene B4 (LTB4) 함량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. IL-1 β 생성량은 MIA 유도군에서 정상군에 비해 증가하였고, 상기생 추출물 및 인도메타신 투여군 (TCE, IM)에서 감소하는 경향성을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5A).

IL-6는 MIA 유도군에서 정상군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 상기생 추출물 및 인도메타신 투여군(TCE, IM)에서 MIA 유도군에 비해 두군 모두 유의적으로 감소하였다(Fig. 5B).

TNF- α 과 LTB4 생성량은 MIA 유도군에서 정상군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 상기생 추출물 처리군은 MIA 유도군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5C and 5D).

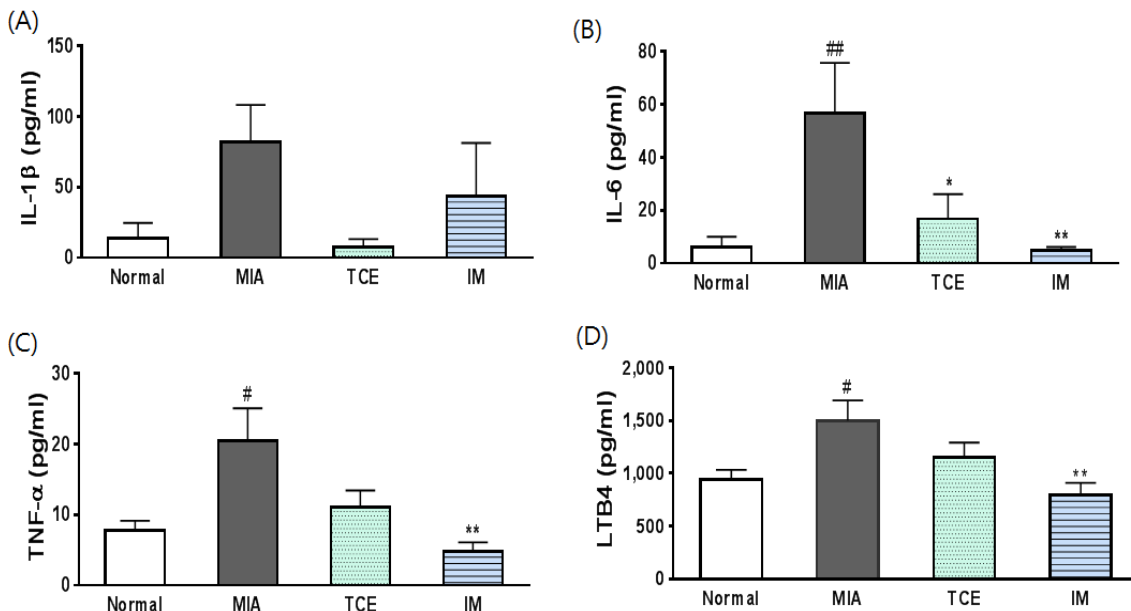


Figure 5. Effects of TCE on serum levels of (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) LTB4 in MIA-induced OA rats. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 6). # p < 0.05 and ## p < 0.01 versus Normal; * p < 0.05 and ** p < 0.01 versus MIA.

5. 조직병리학적 변화 결과

관절조직에 조직병리학적인 변화는 H&E 염색 및 Safranin-O 염색을 통해 확인하였다. MIA 유도군의 경우 정상군과 비교하여 활막 조직 및 연골면의 비정상적인 변화가 관찰되었다. 이로 인해 정확한 관절면의 구조가 관찰되지 않았다. 상기생 추출물 및 인도메타신 투여군에서는 비록 골관절염 증상이 관찰되었지만 관절면의 구조가 유지되어 있으며 MIA 유도군에 비교하여 구조가 정상에 가까웠다(Fig. 6). 또한,

Safranin-O 염색을 통해 연골세포를 관찰한 결과에서도 MIA 유도군에서는 연골세포가 거의 관찰되지 않았다. 그러나, 상기생 추출물 투여군과 인도메타신 투여군에서는 MIA 유도군에 비해 정상적인 활막 조직 및 관절면을 관찰할 수 있었으며, Safranin-O에 양성으로 염색된 부위가 많았다. 이를 통해 상기생 추출물 투여는 골관절염에 의한 활막 조직 및 연골 등의 조직 손상을 완화시키는 것을 확인하였다(Fig. 6).

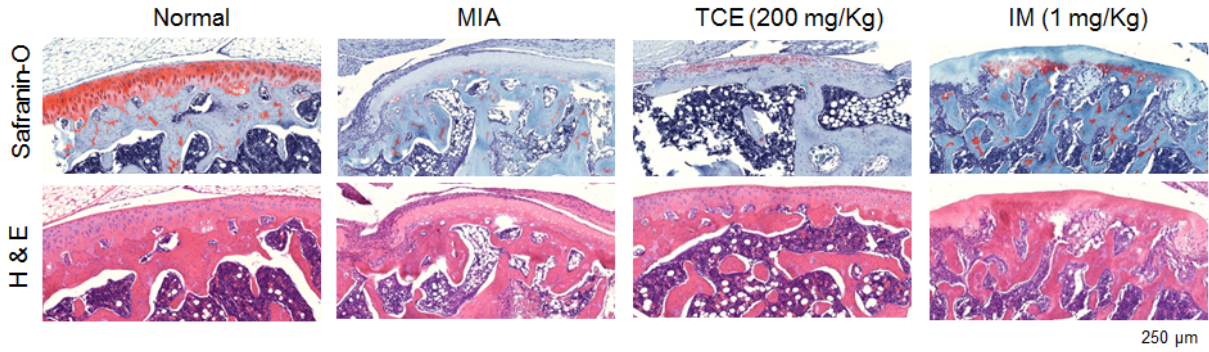


Figure 6. Histopathological features of knee joint tissue of MIA-induced OA rats. Representative photographs of knee joint tissues stained with Safranin-O and H&E (×100 magnification). Scale bars = 250 μm.

IV. 고 찰

본 연구에서는 MIA 유도에 의한 동물모델을 대상으로 상기생 추출물의 골관절염에 대한 보호효과 여부를 확인하고자 하였다.

상기생 추출물의 성분분석을 위해 HPLC 성분분석을 실시한 결과, 기존의 문헌에서 보고된 바와 같이 quercitrin과 catechin 성분이 확인 되었다. Zhang 등¹⁵⁾은 상기생의 줄기에서 quercitrin 등의 플라보노이드류를, Moghadamtousi 등²⁰⁾은 catechin 등이 함유되어 있다고 보고하였다. 상기생 기원식물 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser [= *Loranthus chinensis* DC.]의 정명에 의해 문헌조사 검색 결과, 상기생의 이화학적 분석연구는 단편적으로 시행되었거나, 상기생으로부터 분리된 성분이 일부 보고되었으므로²¹⁾, 주요 성분에 대한 추가적인 분석연구가 필요할 것으로 보인다.

MIA는 골관절염 유발 물질로 관절연골세포의 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질이다. 쥐를 대상으로 MIA에 의한 골관절염 유발 실험에서 나타나는 관절 연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등이 인체의 골관절염과 유사하다고 알려져 있다²²⁾. 따라서 본 연구에서는 MIA로 유도된 골관절염 동물모델을 사용하였다. MIA 주입 7일째에 윤활막과 주위 조직 내에서 변형이 발생하고²³⁾, 파골세포와 골아세포의 활동이 증가하면서 관절 연골의 소실로 인해 연골 하골에 부하가 증가하게 된다²⁴⁾. 상기생 추출물의 골관절염에 대한 영향을 알아보기 위해 MIA 유도된 동물모델에서 체중 및 뒷다리체중부하 측정 변화관찰, 혈청 내 염증관련 인자, 관절 내부 조직병리학적 변화를 살펴보았다.

상기생 추출물의 섭취에 따른 체중 변화 관찰 결과 전체 투여

기간에 걸쳐 전반적으로 고른 체중 증가가 관찰되었고, 특이한 행동학적인 이상소견 및 임상증상이 관찰되지 않았다. 일반적으로 AST, ALT는 간세포 내에 존재하는 효소로서 간에서 염증이거나 간세포의 파괴가 일어나게 되면 정상 수준보다 더 많은 AST, ALT가 혈액 속으로 분비 된다²⁵⁾. 본 실험에 사용한 모든 군에 혈중 AST 및 ALT 수준이 정상 범위에 있는 것으로 나타났으며, 이를 통해 본 실험기간에 사용된 상기생 추출물 200 mg/kg/day 용량 수준에서는 간독성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

실제 임상에서 골관절염은 염증 부위에 심각한 부종과 함께 통증을 동반하여 염증이 있는 위치와 반대 다리에 체중을 의지하게 되며, 이로 인한 운동장애는 근육 손실로 이어진다²⁶⁾. 골관절염이 유도된 흰쥐의 뒷다리 체중부하 비율 변화를 관찰해본 결과, 정상군에 비해 대조군에서는 실험기간 내내 유의적으로 감소한 반면 상기생 추출물 투여군에서는 21일 경과 시점에서 골관절염 유도군 대비 유의적으로 증가하였다. 이는 상기생 추출물 투여에 의해 골관절염의 통증을 완화시켜 뒷다리 체중부하가 고르게 분포되어 증상을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

연골의 항상성 유지에 중요한 연골세포의 변화와 사멸로 인하여 세포외기질의 생산이 감소하고 분해가 촉진되면서, 연골의 기본 구조가 파괴되어 관절부하를 견디지 못한다²⁷⁾. 이러한 연골 파괴 과정에 IL-1β, TNF-α 및 IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인이 염증성 활막에서 다량 생산되어 기질의 합성을 저해하고 분해를 촉진하며, 파골세포의 생성을 유도하여 골관절염을 일으킨다. 그러므로 염증효소의 억제가 관절염 치료에서 중요한 역할을 하게 된다^{28,29)}. 혈액 내 cytokine의 변화를 확인하기 위해 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 함량을 측정된 결과, 골관절염 유도군 대비 상기생 추출물 투여군에서 혈청 내 염

중성 인자들을 감소시키는 것으로 나타나 상기생 추출물 투여가 관절 내 염증 반응을 억제하여 골관절염의 진행을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한, 염증성 매개인자로서 LTB4는 염증을 악화시키고, 골관절염의 증상 및 관절액에서 염증세포 숫자와 상관관계를 나타내는 인자로 알려져 있으며³⁰⁾, LTB4 억제제가 골관절염에 치료효과가 보고되었다³¹⁾. 본 연구에서 상기생 추출물 투여군은 LTB4를 감소시킴으로써 골관절염에 대한 치료 효과를 확인할 수 있었다.

골관절염은 관절 연골의 퇴행성 질환으로, 기질의 감소와 구성요소의 합성 억제로 인한 연골의 파괴를 특징으로 하며, 골극 형성, 골 경화 및 미세골절, 경증의 활막 염증 등과 같은 병리적 소견을 보인다. 관절조직 내 조직병리학적 변화 결과에서 상기생 추출물 처리군은 골관절면 보호 여부를 확인하였고, Safranin-O 염색을 통해 상기생 추출물의 투여가 연골세포를 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 상기생 추출물은 골관절염 유발 rat에 대한 뒷다리 체중 부하 측정을 통한 관절증상 완화 정도, 염증 매개 인자, 연골량 및 병리조직학적 변화를 관찰한 결과, 골관절염 유발 인자 감소 효과를 통해 연골과 관절조직을 보호하면서 골관절염 증상을 완화 시켰다. 본 결과를 통해 상기생 추출물의 골관절염의 치료 효과는 확인하였으나, 이에 대한 기전 연구 부분은 추가적으로 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구에서는 MIA 유도에 의한 골관절염 동물모델에서 상기생 물추출물의 골관절염에 치료효과를 확인하기 위해 체중 및 간 기능지표, 뒷다리체중부하, 혈청 내 염증관련 인자 및 관절 내부 조직병리학적 변화를 비교·분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 형태감별 및 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 동정된 상기생 시료를 이용하여 물추출물을 제조하였으며, 이에 대한 HPLC 성분분석을 실시한 결과, 기존의 문헌에서 보고된 바와 같이 catechin과 quercitrin 성분이 확인되었다.
2. 상기생 추출물의 섭취에 따른 체중 및 간독성 지표 결과 전체 투여기간에 걸쳐 전반적으로 고른 체중 증가가 관찰되었고, AST, ALT 수준이 모든 군에서 정상 범위에 있는 것으로 나타나, 상기생 추출물 200 mg/kg/day 용량 수준에서는 모든 실험군에서 일반 독성 및 간독성은 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다.
3. 뒷다리 체중부하 비율 변화를 관찰해본 결과, 정상군에 비해 MIA 유도군은 실험기간 내내 유의적으로 감소한 반면 상기생 추출물 투여군은 21일 경과시점에서 MIA 유도군 대비 유의적으로 증가하여, 상기생 추출물의 투여에 의해 골관절염의 통증이 완화되고 골관절염 증상을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

4. 혈청 내 염증성 cytokine 및 매개인자(IL-1 β , IL-6, TNF- α , LTB4)의 생성량 측정 결과, MIA 유도군 대비 상기생 추출물 투여군에서 혈청 내 염증성 인자들을 감소시키는 것으로 나타나 관절 내 염증 반응을 억제하는 것을 확인하였다.

5. 관절조직 조직병리학적 변화 결과 상기생 추출물 처리군은 골관절면 보호와 연골세포를 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 상기생 추출물은 골관절염 유도 rat에서 연골과 관절조직을 보호하면서 통증완화 및 항염증효과를 보여 골관절염 증상을 완화시키는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '대체 한약자원의 유효성 평가'(K18402) 사업 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Kumar V, Al-Abbasi FA, Ahmed D, Verma A, Mujeeb M, Anwar F. *Paederia foetida* Linn. inhibits adjuvant induced arthritis by suppression of PGE(2) and COX-2 expression via nuclear factor- κ B. *Food Funct.* 2015 ; 6(5) : 1652-66.
2. Choi BC. Knee Osteoarthritis (1). Issue & Trend. Korea Pharmaceutical Information Center, 2017 ; 1-17. Published on the Internet; <http://www.health.kr/researchInfo/issue&trend.asp>
3. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011 ; 23(5) : 471-8.
4. Woo KJ and Oh KW. Prevalence of Osteoarthritis among Adults over 50 years old in Korea, 2010-2013. *Public Health Weekly Report.* 2015 ; 8(4) : 82-4.
5. Cho H, Kim YL, Jeong YJ, Jung J. Associations between Osteoarthritis and Metabolic Syndrome in Korean Adult: The 5th Korean National Health and Nutrition Examination Survey, 2010-2012. *Korean J Fam Pract.* 2018 ; 8(2) : 292-8.
6. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, Hawker GA, Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H, Kwoh K, Lohmander S, Rannou F, Roos EM, Underwood M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 ; 22(3) : 363-88.
7. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015 ; 386(9991) : 376-87.
8. Shen CL, Smith BJ, Lo DF, Chyu MC, Dunn DM, Chen

- CH, Kwun IS. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J Nutr Biochem*. 2012 ; 23(11) : 1367–77.
9. Korea Food & Drug Administration (KFDA). Guideline for the efficacy of herbal medicinal product - Osteoarthritis-. KFDA, 2009 : 1–14. Available from : URL : https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/list.do
 10. KFDA. The latest editions of Korean Herbal Pharmacopoeia (KHP). Notification No. 2017–85 of the Ministry of Food and Drug Safety, 2017.
 11. Park J and Choi G. Review on Herbal Medicinal Materials in the Korean Pharmacopoeia and the Korean Herbal Pharmacopoeia. *Korean Herb Med Inf*, 2016 ; 4(2) : 9–35.
 12. Korea Institute of Oriental Medicine. Defining dictionary for medicinal herbs [Korean]. Retrieved June, 25, 2018, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex/>.
 13. Jeong J and Jeong JC. Effects of *Taxilli Ramulus* Extract on Bone Metabolism of *Ethanol Treated* Rats. *J Korean Oriental Med*. 2001 ; 22(4) : 1–9.
 14. Baek JM, Kim JY, Lee MS, Jeung WJ, Moon SY, Jeon BH, Oh JM, Choi MK. Inhibition Effect of *Taxilli Ramulus* Extract on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2013 ; 27(4) : 431–6.
 15. Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Bartlett J, Shanmugam K, Münch G, Wu MJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *J Agric Food Chem*. 2011 ; 59(23) : 12361–7.
 16. Korean Medicinal Materials compilation committee. *Korean Medicinal Materials Volume 2*. Korea Institute of Oriental Medicine, 2016 ; 54–9.
 17. Moon BC, Kim WJ, Yang S, Park I, Yeo SM, Noh P. Molecular authentication of *Lepidii seu Descurainiae* Semen by the development of *matK* amplification primers and analysis of sequences. *Kor J Herbol*. 2018 ; 33(3) : 25–35.
 18. Kim NJ, Park JY, Han HC, Chang SH. Analgesic and anti-inflammatory effects of Ibuprofen, Indomethacin and NS-398 on an acute model of arthritis in rats. *Korean J Anesthesiol*. 2001 ; 40(6) : 802–14.
 19. McDougall JJ, Watkins L, Li Z. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain*. 2006 ; 123(1–2) : 98–105.
 20. Moghadamtousi SZ, Kamarudin MN, Chan CK, Goh BH, Kadir HA. Phytochemistry and biology of *Loranthus parasiticus* Merr, a commonly used herbal medicine. *Am J Chin Med*. 2014 ; 42(1) : 23–35.
 21. Ding B, Dai Y, Hou YL, Wu XM, Chen X, Yao XS. Four new hemiterpenoid derivatives from *Taxillus chinensis*. *Fitoterapia*. 2013 ; 86 : 1–5.
 22. Cho HJ, Jang JB, Jung JU, Sung SC, Kim TK. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis in elderly Koreans. *Knee surgery & related research*. 2009 ; 21(4) : 223–31.
 23. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 ; 11(11) : 821–30.
 24. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondralbone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol*. 2003 ; 31(6) : 619–24.
 25. Han ZZ, Xu HD, Kim KH, Ahn TH, Bae JS, Lee JY, Gil KH, Lee JY, Woo SJ, Yoo HJ, Lee HK, Kim KH, Park CK, Zhang HS and Song SW. Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Lab Anim Res*. 2010 ; 26(2) : 153–64.
 26. Lee CK. Current Clinical Practice: Osteoarthritis. *The Korean J Medicine*. 2000 ; 59(2) : 246–9.
 27. Yun JH. Current Clinical Practice: Osteoarthritis Update. *The Korean J Medicine*. 2012 ; 82(2) : 170–4.
 28. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose 6 phosphate isomerase. *Arthritis Rheum*. 2008 ; 58(3) : 754–63.
 29. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, Gravallesse E, Mathis D, Benoist C. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody induced arthritis. *J Exp Med*. 2002 ; 196(1) : 77–85.
 30. Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 ; 15(5) : 623–7.
 31. Griffiths RJ, Smith MA, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, Scampoli DN, Eskra JD, Byrum RS, Koller BH, McNeish JD. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J Exp Med*. 1997 ; 185(6) : 1123–9.