

MIA로 유발된 골관절염 동물모델에서 산약 추출물의 골관절염 개선 효과

김민주^{1#}, 박해진², 김경조¹, 이진아¹, 신미래¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 한방식품영양조리학부

Protective Effect of Dioscoreae Rhizoma Extracts in MIA-induced Rat.

Min Ju Kim^{1#}, Hae-Jin Park², Kyeong Jo Kim¹, Jin A Lee¹, Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbol, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Department of Food Science and Nutrition, Daegu Hanny University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Osteoarthritis is characterized by degeneration of articular cartilage, which is characterized by chronic pain, stiffness and decrease range of motion. The present study was designed to compare the therapeutic effect of Dioscoreae Rhizoma water extract (DRW) and Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract (DRE) on the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats.

Methods : Osteoarthritis was induced by injection of MIA (50 μ l with 80 mg/ml) into the knee joint cavity of rats. After adaptation period for seven days, rats were divided by 5 groups (n=10/group): normal group, control group, positive control (indomethacin 5 mg/kg), DRW 200 mg/kg treated group, DRE 200 mg/kg treated group (n=10/group). The hind paw weight distribution was measured with the changes of reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (ONOO⁻) in articulation tissue. Also, the cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-6 (IL-6), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) were investigated by western blot analysis.

Results : The administration of DRW and DRE significantly decreased the hind paw weight distribution. The ROS and ONOO⁻ levels of cartilaginous tissue were significantly decreased in DRW and DRE compared to control group. The results showed that DRE decreased inflammatory cytokines such as iNOS and TNF α . Also DRE decreased MMP-1 and increased TIMP-1.

Conclusions : Based on the above results, Dioscoreae Rhizoma extract seems to have the therapeutic effect on osteoarthritis via suppression of inflammation.

Key words : Osteoarthritis, monosodium iodoacetate (MIA), Dioscoreae Rhizoma, Inflammation, MMP, TIMP

I. 서 론

山藥 (Dioscoreae Rhizoma)은 마과 (Dioscoreaceae)에 속하는 다년생초본인 참마 (*Dioscorea japonica* Thunberg) 또는 마 (*Dioscorea batatas* Thunberg)의 뿌리줄기에서 주피를 제거한 후 건조한 약재이다.味는甘하고,性은溫하며固腎,

健脾,益精,補肺 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾.山藥은 점질 다당류를 함유하면서,구성성분은 주로 수용성 아세틸화된 아세틸 만난으로 이루어진식이섬유가 대부분이다²⁾.山藥의 주요 성분인 gracillin, methyl protoneogracillin, dioscin, methyl protodioscin 등은 인간 암세포에 대한 골다공증 억제 효과,면역조절 효과,항종양 효과,phospholipase

*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, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

· Received : 15 Apr 2019 · Revised : 19 Jul 2019 · Accepted : 25 Jul 2019

A₂ 저해작용 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 콜레스테롤 저하 작용, 혈당강하 효과, 항비만 효과 등의 약리작용이 보고되어 있다³⁾.

염증 (inflammation)은 세균의 침입이나 외상과 같은 외부로부터의 자극에 생체조직이 방어하는 반응에서 일어나는 대표적인 현상으로, 염증반응이 발생하게 되면 여러 매개인자들의 생성이 증가하게 되어 발적, 동통 등의 증상들이 나타나게 된다⁴⁾. 관절을 보호하는 연골이 손상되거나 관절을 이루는 인대, 뼈 등이 손상을 입어 통증 및 염증이 생기는 골관절염 (osteoarthritis)은 크게 선천적 요인과 후천적 요인에 따라 구분된다. 퇴행성 변화, 감염, 면역계 이상, 외상, 대사 장애 등이 원인이 되어 관절을 보호하는 연골의 손상이나 관절을 이루고 있는 인대와 뼈 등에 손상이 일어남에 따라 염증, 통증, 부종, 강직의 증상이 나타나는 만성 퇴행성 골관절염 질환은 후천적 요인에 의해 나타나게 되며^{5,6)}, 유전적 요인으로는 직계 여성 가족들 가운데 골관절염 환자가 있는 경우 발병률이 2~5배 증가한다고 알려져 있다⁴⁾. 골관절염의 한의학적 병태생리는 肌肉, 筋骨, 肢體 및 關節 등에 發赤, 屈伸不利, 關節腫脹, 熱感, 麻木 등의 증상을 나타내는 痺病證의 범주에서 이해되었으며, 치료에 있어서도 痺證의 치료법을 주로 이용해 왔다⁷⁾. 현재 골관절염의 치료법으로는 소염진통제, 비스테로이드성 소염진통제, 연골 보호제 등을 사용하는 약물치료와 인공관절 치환술 (replacement arthroplasty)과 같은 비약물 치료법이 이용되고 있다. 약물치료 요법을 장기간 진행할 경우 위장장애, 간 장애, 신기능 장애 등의 부작용이 나타나며, 비약물 치료 요법은 재수술을 해야 하거나 염증이 재발하는 경우 등의 부작용이 나타난다⁸⁾.

MIA (monosodium iodoacetate)는 투여 농도에 따라 여러 수준으로 관절의 퇴화와 기능장애를 유발할 수 있으며, 관절의 퇴행된 수준에 따라 통증의 정도를 평가할 수 있다고 알려져 있다⁹⁾.

山藥에 대한 골다공증 억제 효과 등 세포실험 및 동물실험에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나, 골관절염 유발 동물모델에 대한 효능평가는 진행되지 않아 다양한 연구결과가 필요한 실정이다. 이에 본 연구는 MIA로 골관절염이 유발된 rats에 경북지역내 10곳의 산지에서 생산된 10종 山藥 물 추출물과 30% ethanol 추출물을 경구 투여하며 골관절염 유발 후 뒷다리 체중부하를 측정하였으며, 희생 후 관절조직에서의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS), peroxynitrite (ONOO⁻)와 웨스턴 블롯을 통한 염증성 cytokine 발현량을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

7주령의 Sprague-Dawley (SD)계 체중 180~220 g의 수컷 흰쥐 하나바이오테크 (경기, 한국)에서 구매하여, 물과 고형 사료 (조단백질 18% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 마그네슘 0.15% 이상 NIH-41, Zeigler Bros, Inc., USA)를 충분히 공급하며 1주

일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 명암주기는 12시간 주기, 온도 22 ± 2℃, 습도 50 ± 5%로 조절하였다. 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2019-049)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

2. 시료 추출

본 실험에 사용한 10종의 山藥은 경상북도 지역에서 생산 되는 것을 구매하여 대구한의대 본초학교실에서 정선, 감별하여 사용하였다 (Table 1). 물 추출물은 10종의 山藥 30 g씩, 총 300 g에 10배수의 증류수 3 L를 가하여 열탕 추출기를 사용하여 2시간 열수 추출을 시행하였다. 추출물을 여과하여 여과액을 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기에서 완전히 건조시켜 43.1 g의 파우더를 얻었으며 수율은 14.37%였다. 얻은 파우더를 냉동(-80℃) 보관하여 실험 직전에 사용하였으며 이를 DRW라고 하였다. 30% ethanol 추출물은 10종의 山藥 20 g씩, 총 200 g에 10배수의 30% ethanol 2 L를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출한 후 여과하였다. 여과한 액을 감압 농축장치를 사용하여 농축한 후 동결 건조기에서 완전히 건조시켜 19.4 g의 파우더를 얻었으며 수율은 9.7%였다. 얻은 파우더를 냉동(-80℃) 보관하여 실험 직전에 사용하였으며 이를 DRE라고 하였다.

Table 1. Country of Origin of 10 Kinds of Dioscoreae Rhizoma

No.	Sample	생산지
1	DR 1	경북 안동
2	DR 2	경북 영천
3	DR 3	경북 의성
4	DR 4	경북 안동
5	DR 5	경북 의성
6	DR 6	경북 영천
7	DR 7	경북 안동
8	DR 8	경북 안동
9	DR 9	경북 안동
10	DR 10	경북 안동

3. 시약

본 실험에 사용된 potassium persulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), monosodium iodoacetate (MIA), indomethacin, dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 1차 항체는 Thermo

Scientific (Rockford, IL, USA) 구입 하였고, 2차 항체인 Mouse IgG antibody는 GeneTex, Inc. (GeneTex, San Antonio, TX, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor mixture, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입 하였으며, Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4. 골관절염 효능 평가

1) 골관절염 유발

실험동물의 오른쪽 무릎 주변의 털을 깨끗이 제모한 후, 0.9% saline으로 희석한 MIA (monosodium iodoacetate)를 0.3 ml insulin 주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 μ l (80 mg/ml)씩 주입하여 골관절염을 유발하였다.

2) 군 분리 및 약물투여

MIA로 유발 7일 후 뒷다리 체중 부하 검사를 통해 골관절염이 유발된 실험동물을 각 군당 10마리씩 5그룹으로 구분하여 실험을 진행하였다. 실험군은 골관절염을 유발하지 않은 정상

군 (Nor), 골관절염 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군 (Veh), 골관절염 유발 후 indomethacin을 5 mg/kg로 경구 투여한 양성대조군 (Indo), 골관절염 유발 후 DRW를 200 mg/kg로 경구 투여한 DRW군, 골관절염 유발 후 DRE를 200 mg/kg로 경구 투여한 DRE군으로 약물은 2주간 투여하였다.

3) 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 전자체중계로 1회/2일으로 동일 조건에서 측정하였고, 식이섭취량은 제공된 사료에서 2일간 섭취하고 남은 사료의 양을 측정한 후 각 실험군의 하루 사료 섭취량을 산출하였다.

4) 뒷다리 체중 부하 측정

뒷다리 체중 부하는 MIA로 골관절염을 유발하기 1일전, 유발 후 7일, 14일, 21일에 측정하였다. Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., UK)를 이용하여 오른쪽, 왼쪽 뒷다리 부하 무게를 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 \pm 표준편차로 나타내었으며, 다음의 식을 이용하였다.

$$I \text{ 체중부하비율} = \frac{\text{정상뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}}$$

$$II \text{ 상대적 체중 부하} = \frac{\text{각 군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의평균 체중 부하 비율}} \times 100$$

5) 산화적 스트레스 바이오마커 측정

관절조직 내의 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 5분 간격으로 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 485 nm를 이용하여 0분부터 30분간 측정된 값을 이용하여 산출하였다¹⁰⁾. 또한 ONOO⁻를 측정하기 위하여, Kooy 등의 방법을 시행하여 측정하였다¹¹⁾. 각 샘플을 pH 7.4의 rhodamine buffer와 5mM DHR123과 섞은 후 5분간 37 $^{\circ}$ C에서 흔들어 준 후 5분 간격으로 emission wavelength of 535 nm와 excitation wavelength of 480 nm를 이용하여 0분부터 30분간 측정된 값을 이용하여 산출하였다.

6) 관절조직 Western blotting

2주간의 약물투여가 끝난 뒤 오른쪽 무릎 부위를 절단하여 관절조직을 채취한 다음 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail, 0.1 M DTT를 첨가시킨 buffer A를 넣은 후 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)를 사용해 분쇄한 뒤 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 이후 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후, 12,000 rpm으로 2

분간 원심분리시켜 세포질을 포함한 상태인 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 μ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 후 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80 $^{\circ}$ C에서 각각 냉동 보관 하였다. 세포질 내의 MMP-1, TIMP-1, iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α , β -actin의 단백질 발현을 측정하기 위해 10 μ g의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 8회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 다음, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

5. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균차이에 대한 통계적 유의성을 p-value < 0.05에서 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중 및 식이섭취량

골관절염 유발 후 2주간의 약물투여 기간 동안 측정된 체중 변화량은 정상군 61.88 ± 6.78 g, 대조군 59.75 ± 7.69 g, Indo군 61.86 ± 3.22 g, DRW군 67.60 ± 5.71 g, DRE군 70.17 ± 24.48 g으로 각 군간의 유의성은 나타나지 않았다. 식이섭취량 또한 정상군 42.02 ± 5.85 g, 대조군 41.22 ± 5.79 g, Indo군 38.38 ± 5.61 g, DRW군 43.23 ± 5.51 g, DRE군 43.36 ± 5.84 g으로 각 군간의 유의성은 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. Body Weight and Food Intake

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)
Nor	303.50 ± 10.35	365.38 ± 14.54	61.88 ± 6.78	42.02 ± 5.85
Veh	285.80 ± 17.74	345.55 ± 24.04	59.75 ± 7.69	41.22 ± 5.79
Indo	288.75 ± 10.54	348.07 ± 9.91	61.86 ± 3.22	38.38 ± 5.61
DRW	289.65 ± 14.00	357.25 ± 17.70	67.60 ± 5.71	43.23 ± 5.51
DRE	294.33 ± 14.29	364.50 ± 36.14	70.17 ± 24.48	43.36 ± 5.84

Nor ; normal rats, Veh ; MIA-induced osteoarthritis rats, Indo ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, DRW ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma water extract 200 mg/kg body weight, DRE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SD, n=10 rats per group.

2. 뒷다리 체중 부하 측정 결과

뒷다리 체중 부하는 골관절염을 유발하기 하루 전, 유발 후 7일, 14일, 21일 총 4번 측정하였다. 정상군의 뒷다리 체중 부하 비율을 100으로 하였을 때, 각 군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정한 결과, MIA 유발 7일 후에는 대조군 230.82 ± 20.91, Indo군 223.03 ± 18.37, DRW군 215.18 ± 13.30, DRE군 230.53 ± 14.36으로 각 군 간의 유의한

차이는 없었다. 그러나 MIA 투여 14일 후에는 대조군 204.55 ± 7.01, Indo군 171.78 ± 15.96, DRW군 175.84 ± 24.24, DRE군 149.94 ± 9.68 (p < 0.01)로 나타나 DRE군에서 뒷다리 체중 부하가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 21일 후에는 대조군 202.08 ± 12.31, Indo군 140.65 ± 9.75 (p < 0.001), DRW군 145.37 ± 6.62 (p < 0.001), DRE군 139.11 ± 8.88 (p < 0.001)로 나타나 Indo군, DRW군, DRE군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 1).

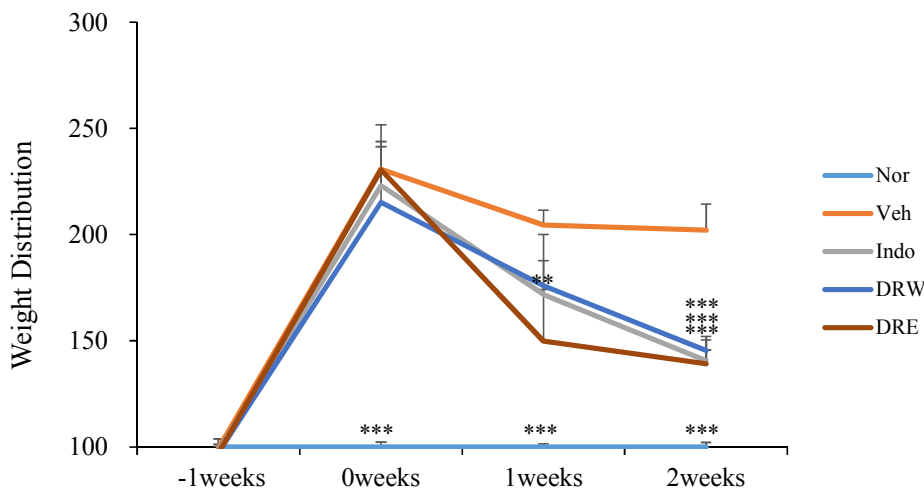


Fig. 1. The changes in relative hind paw weight distribution in MIA-induced osteoarthritis rats. Nor ; normal rats, Veh ; MIA-induced osteoarthritis rats, Indo ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, DRW ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma water extract 200 mg/kg body weight, DRE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SD, 10 rats per group. Significance: **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rats.

3. 산화적 스트레스 바이오마커 측정 결과

산화적 스트레스 바이오마커 측정을 위하여 관절조직을 이용하여 ROS, ONOO⁻를 측정하였다. ROS 측정 결과, 대조군은 163338 ± 25273 fluorescence/min/mg protein로 정상군 115129 ± 17091에 비하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 양성 대조군인 Indo군은 142318 ± 25964로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 DRW군 101482 ± 7017, DRE군 97088 ± 14699은 대조군에 비하여 유의하게 감소한

것을 확인하였다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). ONOO⁻를 측정한 결과, 대조군은 33758 ± 2428 fluorescence/mg protein로 정상군 17004 ± 2807에 비해 유의하게 증가한 것을 확인 할 수 있었다 ($p < 0.001$). 양성 대조군인 Indo군 17471 ± 2992과 DRW군 26204 ± 2578은 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.05$). DRE군은 25487 ± 1861로 유의하진 않지만 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2).

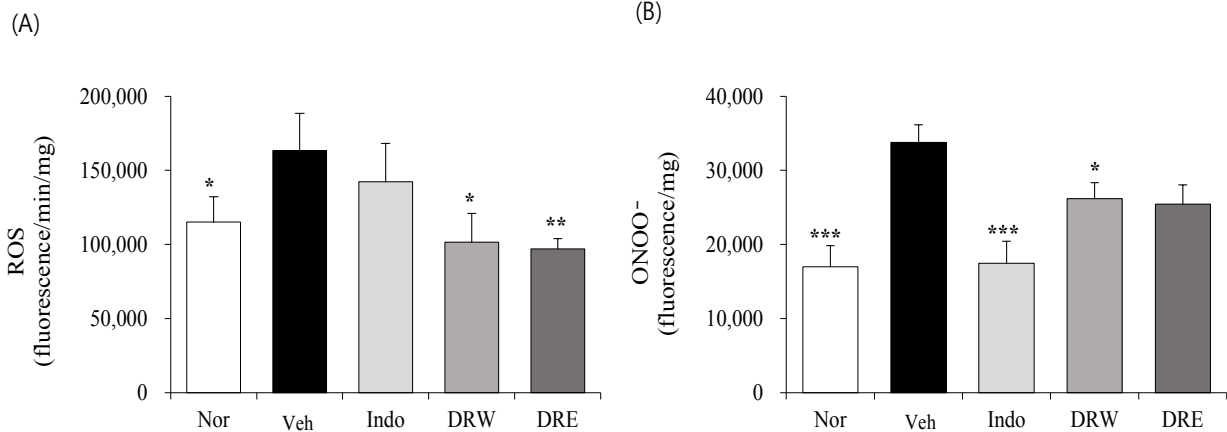


Fig. 2. Oxidative stress biomarker in articular tissues.

Oxidative stress biomarker reactive oxygen species (ROS) and produces peroxynitrite (ONOO⁻) in articular tissue. Nor ; normal rats, Veh ; MIA-induced osteoarthritis rats, Indo ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, DRW ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma water extract 200 mg/kg body weight, DRE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SD, n=10 rats per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats.

4. 관절조직 내 염증성 단백질 발현량 분석

Western blot으로 관절조직에서 염증성 매개인자인 iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 의 발현량을 분석하였다. iNOS의 발현량을 측정된 결과, 대조군은 1.47 ± 0.09로 정상군 1.00 ± 0.15에 비하여 유의적으로 높게 발현하였다($p < 0.001$). 양성 대조군인 Indo군은 1.23 ± 0.15로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). DRW군 1.47 ± 0.11과 DRE군 1.42 ± 0.19로 대조군 대비 감소하는 경향을 나타냈다. COX-2 단백질 발현량을 측정된 결과, 대조군 1.81 ± 0.36로 정상군 1.00 ± 0.19에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 양성대조군인 Indo군은 1.15 ± 0.35, DRW군 1.24 ± 0.30, DRE군은 1.31 ± 0.17으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$). IL-6 단백질 발현량 측정 결과, 대조군 1.49 ± 0.21로 정상군 1.00 ± 0.16에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 양성 대조군인 Indo군 1.06 ± 0.16, DRW군 1.26 ± 0.22, DRE군 1.20 ± 0.10로 대조군 대비 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$). TNF- α 의 경우, 대조군 1.70 ± 0.34은 정상군 1.00 ± 0.08에 비해 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 양성대조군인 Indo

군에서는 1.09 ± 0.16, DRW군 1.27 ± 0.17과 DRE군은 1.13 ± 0.14은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.01$) (Fig. 3).

5. 관절조직 내 TIMP-1, MMP-1 발현량 분석

관절조직 내 TIMP-1 단백질 발현량을 측정된 결과, 대조군은 0.59 ± 0.28으로 정상군은 1.00 ± 0.25에 대비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 양성대조군인 Indo군은 0.83 ± 0.18로 대조군에 비해 증가하였으나 유의적이지는 않았다. DRW군 0.87 ± 0.22, DRE군 0.95 ± 0.28은 대조군 대비 유의하게 증가하는 것을 확인하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$). MMP-1 단백질 발현량을 측정된 결과, 대조군은 1.40 ± 0.10로 정상군 1.00 ± 0.10에 비하여 유의적으로 높게 발현하였다($p < 0.001$). 양성대조군인 Indo군은 1.18 ± 0.11로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 그러나 DRW군 1.37 ± 0.17, DRE군 1.31 ± 0.10로 대조군에 비해 감소하는 경향만을 나타내었다(Fig. 4).

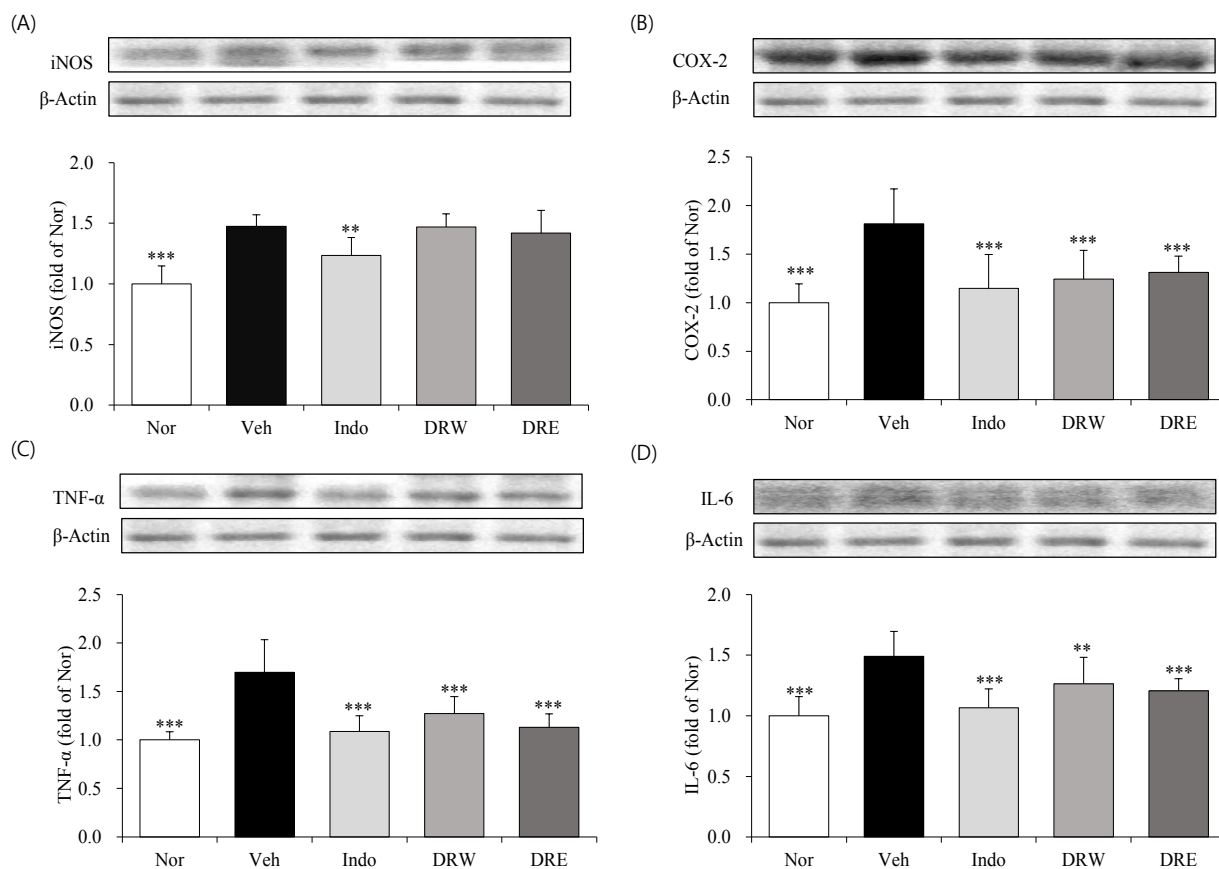


Fig. 3. Expression inflammation-related proteins in articular tissue. Inflammation-related proteins iNOS; (A), COX-2; (B), TNF- α ; (C), IL-6; (D). Nor; normal rats, Veh; MIA-induced osteoarthritis rats, Indo; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, DRW; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma water extract 200 mg/kg body weight, DRE; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=10 rats per group. Significance: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rats.

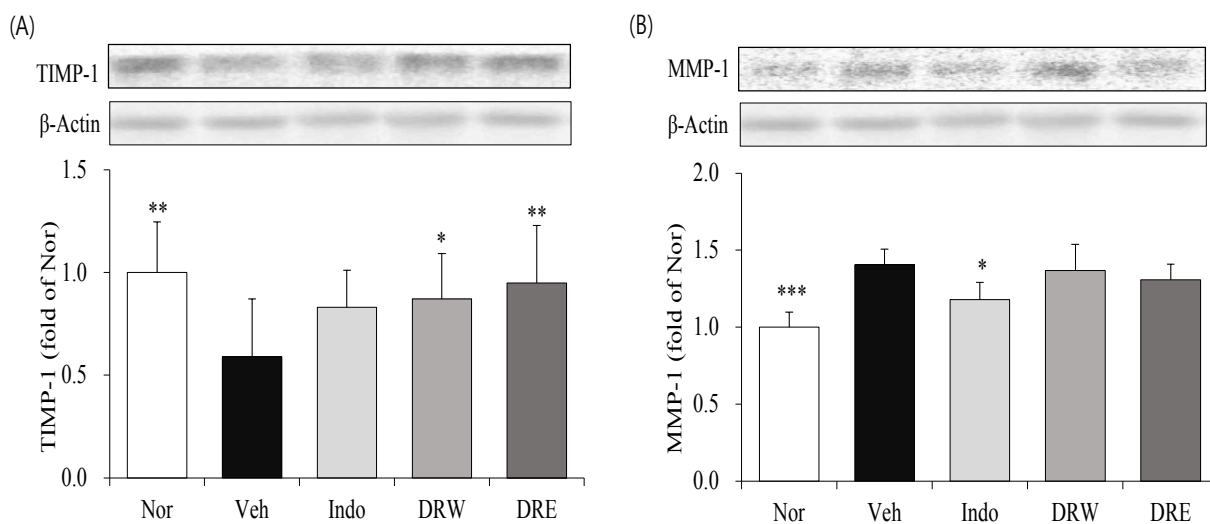


Fig. 4. The expression levels of TIMP-1 and MMP-1 in articular tissue. TIMP-1; (A), MMP-1; (B). Nor; normal rats, Veh; MIA-induced osteoarthritis rats, Indo; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, DRW; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma water extract 200 mg/kg body weight, DRE; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Dioscoreae Rhizoma 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=10 rats per group. Significance: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rats.

IV. 고 찰

山藥 (Dioscoreae Rhizoma)은 백합목 마과 (Dioscoreacea)에 속하는 덩굴성 다년생 초본으로서 한방에서는 담근체의 주피를 벗긴 후 썰서 건조한 것을 사용한다¹²⁾. 이 약의 성미는 평하고甘하다. 약효로는 健脾, 補身, 滋養, 強壯 등의 효능이 있으며, 설사, 식욕부진, 해수, 유정 등의 치료를 위해 많이 사용되어져 왔다. 또한 최근에는 山藥이 면역증가, 항염증, 항암, 혈당강하 등의 효과가 있다고 보고되어지고 있다¹³⁾.

골관절염은 관절의 연골이 닳아 없어지며 한 곳에 퇴행성 변화가 일어나는 증상으로 고령화 현상이나, 체중이 과하게 증가하는 것과 깊은 연관이 있으며 퇴행성 관절질환이라고도 불린다¹⁴⁾. 골관절염은 현재 비만환자의 증가와 고령화 사회로 인하여 발병률이 증가하는 추세이며 조사에 따르면 2008년 성인 중 10.7%가 골관절염에 걸려있으며 나이가 증가함에 따라 비율이 증가하여 80대 이상의 연령에서는 34.5%에 달하는 것으로 보인다¹⁵⁾. 골관절염의 한의학적 병태생리는 肌肉, 筋骨, 肢體 및 관절 등에 發赤, 屈伸不利, 關節腫脹, 熱感, 麻木 등의 증상을 나타내는 痺病證의 범주에서 이해되었으며, 치료에 있어서도 痺證의 치료법을 주로 이용해 왔다⁷⁾. 만성기에는 藥針療法, 刺針法 등 응용하며, 급성기에는 蜂毒療法, 刺針法 등을 병행한다고 알려져 있다^{16,17)}.

MIA로 유발된 골관절염 모델은 연골손상, 통증, 기능장애 등이 실제 골관절염과 비슷하여¹⁸⁾ 골관절염의 한방치료 연구들이 많이 이용되고 있기에 본 연구에서는 경북지역 10종 山藥 물 추출물과 30% ethanol 추출물이 골관절염 치료에 효과가 있는지 알아보기 위하여 MIA로 유발된 골관절염 동물 모델에서 뒷다리 체중 부하 검사, 연골조직에서의 ROS, ONOO⁻ 측정, 염증성 cytokine 발현량을 측정하였다.

체내에 축적되어 정상적으로 소거되지 않은 ROS는 세포를 산화적 스트레스 상태에 이르게 하며, 과도하게 축적된 산화적 스트레스 상태에서의 ONOO⁻는 염증반응과 같은 여러 만성적인 질환 발생에도 관여한다. 또한 DNA와 protein등과 반응하여 세포 손상을 야기시킨다¹⁹⁾. 관절조직에서 ROS를 측정한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 수치가 증가하였으며, 대조군에 비해 DRW군, DRE군에서 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. ONOO⁻를 측정된 결과, 정상군에 비해 대조군에서 수치가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 대조군에 비해 DRE군 보다 DRW군이 더 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

관절 조직 내 염증성 사이토카인의 발현량을 확인하기 위하여 iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 의 발현을 측정하였다. iNOS는 세포 내에서 항상 존재하며, 염증 자극에 의해 NO를 과량 생성하고, 과량으로 생성된 NO는 TNF- α , IL-6, COX-2 등을 과량 생산하여 과도한 면역반응을 일으킨다고 알려져 있다²⁰⁾. COX-2는 염증이 일어난 부위에 주로 존재하며 cytokine 등과 같은 염증 전구물질들에 의해 합성된다²¹⁾. iNOS, COX-2의 발현을 측정된 결과, 정상군 보다 대조군의 발현량이 높게 나왔으며, 대조군 대비 DRW군, DRE군에서 감소하는 경향이 나타났다.

TNF- α 는 전염증성 cytokine으로 골관절염의 염증성 활막에서 과량으로 분비되어 proteoglycan의 분해를 촉진하고 합

성을 저해하는 것으로 알려져 있다²²⁾. IL-6는 염증반응 시 분비되는 염증성 cytokine으로 대식세포나 단핵구에서 분비되며 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, 염증성 증상에 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다²³⁾. IL-6, TNF- α 의 발현을 측정된 결과, 정상군 보다 대조군의 발현량이 유의하게 높게 나왔으며, DRW군 보다 DRE군에서 발현량 더 유의하게 줄어는 경향이 나타났다. 이러한 결과를 통해 DRE가 DRW 보다 염증 억제 효과가 미비한 차이로 조금 더 뛰어난 것으로 사료된다.

관절조직 내 단백질 분해 인자의 발현량을 확인하기 위하여 MMP-1, TIMP-1의 발현을 측정하였다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 기질단백분해효소로 청소년기까지는 생명 현상을 유지하기에 필수적인 조절 단백질지만, 점점 연령이 높아질수록 MMPs가 정상보다 과도하게 발현하여 염증세포의 침윤과 섬유화 등의 병리적 상황이 나타나게 된다²⁴⁾. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)는 MMPs에 길항작용을 하며 서로간의 상호작용에 의해 MMP의 분비를 억제하고 활성도를 조절하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. MMP-1의 발현 측정 결과, 대조군에 비해 DRE군이 DRW군 보다 감소하는 것을 확인하였으며, TIMP-1의 발현량은 대조군 대비 DRE군과 DRW군 모두 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 통해 MIA로 골관절염이 유발된 모델에 경북 지역 10종 山藥 물 추출물과 山藥 30% ethanol 추출물이 개선 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었으며, 경북지역 10종 山藥 물 추출물 보다 30% ethanol 추출물이 골관절염 개선 효과가 있는 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 MIA로 골관절염이 유발된 모델에 경북지역 10종 山藥 물 추출물과 30% ethanol 추출물을 경구 투여하여 골관절염 개선 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뒷다리 체중 부하 측정 결과, DRE군과 DRW군 모두 유의성 있게 감소하였다.
2. 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS를 측정된 결과, 대조군에 비해 DRW군과 DRE군에서 유의하게 감소하는 경향을 나타냈다.
3. ONOO⁻를 측정된 결과, 대조군에 비해 DRE군과 DRW군 모두 유의하게 감소하였지만, DRE군이 미비한 차이로 감소량이 높게 나타났다.
4. 염증 관련 매개인자 및 염증성 cytokine인 iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 의 발현량을 측정된 결과, 정상군 보다 대조군의 발현량이 증가하였으며, DRW군과 DRE군에서 발현량이 감소하는 경향을 나타내었다.

5. 관절조직 내 단백질 분해 인자의 발현량을 확인하기 위하여 MMP-1, TIMP-1의 발현을 측정된 결과, MMP-1의 발현량은 대조군에 비해 미비한 차이로 DRE군이 DRW군 보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, TIMP-1의 발현량은 대조군에 비하여 DRE군과 DRW군 모두 유의하게 증가하는 경향을 나타냈다.

따라서 경북지역 10종 山藥 물 추출물과 30% ethanol 추출물이 MIA로 골관절염이 유발된 모델에서 뒷다리 부하 무게 결과와 염증 관련 매개인자 및 cytokine의 발현량과 관절조직 내 단백질 분해 인자 발현량 측정 결과를 통해 경북지역 10종 山藥 물 추출물과 30% ethanol 추출물은 골관절염 개선에 뛰어난 효과를 나타냈지만, 물 추출물 보다는 30% ethanol 추출물이 미비한 차이로 개선효과가 더 높은 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경상북도와 경산시가 지원한 "2019년 약용작물을 활용한 바이오 메디푸드 기술개발 사업"에 의해 지원되었습니다.

References

1. Yang JM, Lee JH, Sung JS, Kim DI. Proteomic approach to study the antioxidant activities of dioscoreae rhizoma on hela cells. *J Kor Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2008 ; 21(2) : 108-24.
2. Chung HY. Carbohydrates analyses of Korea yam (*Dioscorea*) tubers. *J Kor Food Sci Technol* 1995 ; 27 : 36-40.
3. Park YM, Lim JH, Seo EW. Effect of *Dioscorea* rhizoma on gastritis by acute gastric ulcer in rats. *J Kor Plant Res*. 2015 ; 28(1) : 1-8.
4. Kwon JH, Han MS, Lee BM, Lee YM. Inhibitory effect of *Angelica gigas* extract powder on induced inflammatory cytokines in rats osteoarthritis. *J Kor Printed in the Republic*. 2015 ; 28(4) : 260-9.
5. 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 Kor Diet Assoc*. 2014 ; 20(2) : 99-109.
6. 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.
7. 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.
8. Park S, Kim YS, Lee D, Kwon Y, Park J, Lee SY, Nam DW, Lee JD, Kim H. Efficacy and safety of HT008 and glucosamine sulfate in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized double-blind trial. *Kor. J. Herbology*. 2014 ; 29(4) : 45-52.
9. Kim EN, Roh SS, Jeong GS. Inhibitory Effect of *Sparassis crispa* (Wulf.) Extract on Monosodium Iodoacetate Induced Osteoarthritis. *J Korean Pharmacogn*. 2018 ; 49(3) : 262-9.
10. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992 ; 13(3) : 637-48.
11. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrododamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1994 ; 16(2) : 149-56.
12. Jang SM, Noh SH, Park SD. Botany of herbal medicine resources. Seoul : Hakmun Publishing Ltd. 1999 : 299.
13. Seo CS, Huang DS, Lee JK, Ha HK, Kim HK, Seo YB, Shin HK. Quantitative determination of the marker constituent of *Dioscoreae rhizoma* by the packaging methods. *Kor. J. Herbology*. 2008 ; 23(4) : 45-9.
14. The Korean Orthopedic Association. Orthopedics. Seoul : 最新醫學社. 2006 ; 195-201,517.
15. Jhun HJ, Ahn K, Lee SC. Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and nutrition examination survey. *Anesth Pain Med* 2010 ; 5 : 201-6.
16. Korean College of Rheumatology. KCR textbook of rheumatology. Seoul, Koonja. 2014 : 275-8.
17. Sun Xing. Shen Nong's Materia Medica Beijing. Science and Technology Literature Press, 1999.
18. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2004 ; 370(2-3) : 236-40.
19. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation : the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991 ; 288 : 481-7.
20. Richardot P, Charni-Ben Tabassi N, Toh L, Marotte H, Bay-Jensen AC, Miossec P, Garnero P. Nitrated type III collagen as a biological marker of nitric oxide-mediated synovial tissue metabolism in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 ; 17(10) : 1362-7.
21. Brune K, Hinz B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol*. 2004 ; 33(1) : 1-6.

22. Iwanami K, et al. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose 6 phosphate isomerase. *Arthritis Rheum*, 2008 ; 58 : 754-63.
23. Ji Won Bak, Boo-Yong Sim, Hae jin Lee, Dong Hee Kim. Effect of Cheongungdajosan-gamibang on oxidative damage and inflammation. *Kor. J. Herbology*, 2014 ; 29(4) : 53-9
24. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implication, *J Clin Oncol*, 2000 ; 18 : 1135-49.
25. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004 ; 49(3) : 187-98.