

가시오가피와 양파 혼합 추출물이 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

김경윤 · 심기철 · 김계엽 · 최찬현¹ · 정재근² · 정재선² · 정현우^{1*}

동신대학교 보건복지대학 물리치료학과, 1: 동신대학교 한의과대학, 2: 옥반식품 영농조합법인

Effects of Acanthopanax Senticosus and Onion Mixture Extract on the Collagen-induced Arthritis in Rat Model

Kyung Yoon Kim, Ki Cheol Sim, Gye Yeop Kim, Chan Hun Choi¹, Jai Gon Jung²,
Jae Sun Chung², Hyun Woo Jeong^{1*}

Department Physical Therapy, College of Health and Welfare, 1: College of Oriental Medicine, Dongshin University,
2: Okban Food, Muan, Jeonnam

This study was conducted to determine the analgesic effect of onion and acanthopanax senticosus mixture extract using the rheumatoid arthritis rat model. Rheumatoid arthritis model was made by the intradermal injection of type II collagen emulsified. Rats were divided into four groups: (1) Sham group(n=5), (2) Control group(administered DW 3 ml/1 day after RA induced, n=7), (3) Experimental group I (administered Onion extractor 600 mg/3 ml/1 day after RA induced, n=7). (4) Experimental group III(administered Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor 600 mg/3 ml/1 day after RA induced, n=7). After that, we examined the arthritic index, paw edema, pain threshold at 1st, 14th, 28th days. And also we examined histopathologic study(safranin-O green), immunohistochemical stain(COX-2) of knee joint at 28th days. Arthritic index, paw edema and pain threshold test were decrease in experimental group I, II than control group. Especially group II was most significantly inhibit effect than the other groups at 28th days. On the histopathologic view, all experimental groups were relieved and reproduced the erosion of arthritic site compared with control group. All experimental groups were COX-2 positive cells in the immunohistological stain of the knee joint were significantly decreased compared with control group. Especially group II was most significantly decreased than the other groups at 28th days. Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor can be used for curing rheumatoid arthritis. Anti-inflammatory effects may be somewhat better in combination of Onion and Acanthopanax senticosus.

Key words : onion, acanthopanax senticosus, Type II collagen-induced arthritis

서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)은 근골격계 질환 중 하나로 활액막에 만성적 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직을 파괴하여 초기에는 관절의 부종과 동통을 초래하고, 진행됨에 따라 특징적인 관절 변형 및 강직이 유발되는 대표적인 자가면역성 질환이다^{1,2)}. 일반적으로 우리나라 인구의 1-2%가 류마티스 관절염 질환을 가지고 있으며, 주로 30-50대 여성에

게 호발하며, 발병율은 연령에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다^{3,4)}. 류마티스 관절염은 악화와 완화를 반복하면서 진행되는 만성질환으로⁵⁾ 적극적인 치료에도 불구하고 관절통증과 종창, 운동제한과 관절의 변형으로 일상활동과 같은 신체적 기능과 심리적인 기능에도 영향을 초래한다⁶⁾. 뿐만 아니라 질병의 진행과정이 다양하고 예측하기 어려울 뿐 아니라 완치법이 확실하게 알려져 있지 않기 때문에 평생동안 질병의 진행과정을 완화시키는 관리방법으로 증상을 조절해 나가야 한다⁷⁾. 현재까지 류마티스 관절염에 대한 치료는 통증을 완화하고 관절의 변형을 최소화하기 위한 약물요법과 수술요법 등이 시행되고 있으나 질병을 완치하거나 진행을 완전히 막을 방법이 개발되지 않고 있다⁸⁾.

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 건계로 185 동신대학교 한의과대학

· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2011/09/08 · 수정 : 2011/09/27 · 채택 : 2011/12/08

한의학적으로 류마티스 관절염은 痺證의 범위에 속한다고 볼 수 있는데, 痺란 기혈운행이 不通하거나 근맥관절의 濡養이 失調되었을 때, 風寒濕熱의 邪氣에 感受하여 발생하며 肢體, 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障礙 등을 主要症狀으로 한다^{9,10}.

현재 관절염의 통증 조절과 증상 완화에 주로 사용되고 있는 non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAIDs)의 작용기전은 cyclooxygenase(COX)를 억제하여 진통과 소염작용을 하는 것으로 알려져 있으며¹¹, COX는 arachidonic acid를 prostanoid로 전환시켜 COX-1과 COX-2의 두 가지 동종 효소가 존재하는 것으로 알려져 있다¹². COX-1은 대부분의 조직에 존재하여 위장, 신장, 혈소판 및 혈관의 항상성 유지 등의 정상적인 생리적 기능을 유지하는데 관여하는 prostaglandin(PG)을 합성하는데 관여하고¹³, COX-2는 대부분 정상 조직에서는 거의 발견되지 않지만 염증부위에서 cytokine이나 내독소 등의 자극에 의해 발현이 증가하여 염증반응에 관여하는 prostaglandin(PG)을 합성하는데 관여하고 스테로이드 등에 의해 COX-2의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다¹⁴. COX-2는 염증성 관절염인 류마티스 관절염 활액막에서 증가되고 류마티스 관절염 염증반응에 관여하는 prostaglandin(PG) 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다¹⁵. 그러나 증상 조절에 중요한 역할을 하지만 가장 큰 문제로 위장관 출혈, 항응고 작용, 수분저류 등 다양한 부작용이 심하게 나타나 여러 가지 약제가 병용 투여되고 있다^{16,17}. NSAIDs 소염제의 위장관 부작용이 COX의 비선택적 억제에 의한 것으로 밝혀진 이후 COX-1 억제에 따른 부작용을 최소화하고, 원하는 진통 효과 및 항염증 효과를 얻기 위해 선택적으로 억제하는 COX-2 특이 억제제가 개발되어 사용되고 있으나^{18,19} COX-2 특이 억제제 사용으로 인한 의료비 증가와 부작용 자체로 인해 환자 뿐 아니라 사회 경제학적 측면에서도 많은 부담이 가중되고 있다.

가시오가피는 오갈피나무과인 가시오갈피나무(*Acanthopanax senticosus* H.)의 근피 혹은 수피로 祛風濕, 堅筋骨의 효능이 있어 腰膝酸痛과 下肢痿弱 등을 다스리고, 溫腎化濕의 작용으로 利水消腫의 효능이 있으며^{20,21}, 洋蔥으로 불리는 양파(*Allium cepa* L.)²²는 민간에서 祛痰劑, 利尿劑로 사용되는 식품으로 전남 무안이 전국 양파의 최대 생산지이다.

최근, 자연계에 존재하는 각종 식물체들 중에 들어있는 생리 활성 성분에 대한 관심이 높아지면서 여러 가지 생리적 효능을 갖고 있고 인체에 대한 안전성과 약효가 입증된 천연물을 선호하는 경향이 높아지고 있는 시점에서²³ 가시오가피가 건강기능성 재료로서의 인지도 역시 매우 높은²⁴ 반면, 양파는 지역 내 소규모 가내 수공업 형태로 제품화가 진행되고 있고, 양파 가공품에 대한 효능 및 안전성에 대한 체계적인 연구는 미진한 실정이다. 이에 본 저자들은 양파의 안정적 판로 확보 및 다양한 가공식품 개발을 통한 고부가가치 실현을 위해 지자체, 업체와 함께 지역 특산 생물자원을 활용한 건강성 기능 산업제품을 개발하여 지역 경제 활성화에 새로운 동력원으로 활용하고자 하였다¹⁶.

본 저자들은 기존의 보고²⁵에서 양파음료의 항비만 효과와 안정성을 검증하였기에 이차적으로 가시오가피와 양파를 혼합한 추출물을 류마티스 관절염 모델에 투여하여 부종과 행동반응평

가, 형태계측학적 변화 및 COX-2 변화를 관찰한 결과 유의성 있었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물

체중이 약 250±50 g의 Sprague-Dawley계 백서(8주령, 웅성, 대한실험동물)를 항온 항습(실내온도는 25±1℃, 습도 55±10%)이 유지되는 사육실에서 고형사료(삼양주식회사, Korea)와 물을 자유롭게 먹도록 공급하면서, 1주일 이상 사육실 및 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 이용하였다.

2. 시료의 調劑

본 실험에 사용된 시료 재료는 전남 무안군 특산 양파로 농협 하나로마트(목포, 한국)에서 구입하였고, 가시오가피는 전남 생약조합(화순, 한국)에서 구입하였다. 시료 조제는 전남 무안군의 양파즙 생산업체인 옥반식품영농조합법인의 제조공정(특허번호 10-0794300호)에 맞춰 양파, 양파와 가시오가피 혼합물 각각을 압력 1.20 kg/cm², 온도 120-125℃ 하에서 6시간 전탕한 후 얻어진 추출액을 시료로 사용하였다. 양파 및 가시오가피 2 kg 당 1,200 ml의 추출액을 얻어 이중 양파 100% 시료를 OA1, 양파와 가시오가피 혼합 추출액을 각각 1:1의 비율로 혼합한 것은 OA2로 구분하였고, 조제된 시료는 28일 동안 600 mg/3 ml/1 day로 물에 희석해 경구투여하였다.

3. 관절염 유발

Chicken type II collagen(Sigma, St, Louis, USA)을 0.1 M 아세트산에 4 mg/ml의 농도로 4℃에서 12시간 정도 저어준 다음 동량의 Freund's incomplete Adjuvant(Sigma, St, Louis, USA)와 혼합하여 현탁액으로 만들고 백서의 족척부위에 현탁액을 200 µg/kg을 1회 피내주사한 뒤 7일 후 꼬리기시부에 동량을 추가 접종하였다. 허위군(Sham group)과 대조군(Control group)에는 동량의 생리식염수를 접종하였다. 마지막 접종일로부터 14일째에 發赤, 腫脹, 變形, 畸形 및 關節強直된 백서를 선별하여 실험에 적용하였다(Fig. 1).

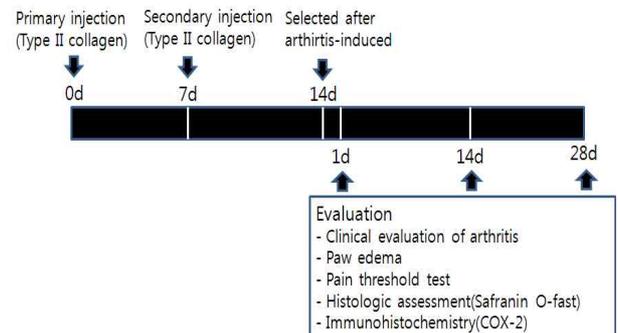


Fig. 1. Experimental scheme in collagen-induced arthritis model.

4. 실험군 분류

실험군은 총 4개 군으로 허위군(Sham group, n=5)과 함께 관절염이 유발된 대조군(control group, n=7), 실험군 I(Group I, n=7), 실험군 II(Group II, n=7)으로 하였다. 허위군과 대조군은 28일 동안 1일 1회 생리식염수를 3 ml씩 경구투여하였고, 실험군 I은 일반양파 추출액(OA1)을, 실험군 II는 일반양파와 가시오가피 추출액(OA2)으로 oral zonde needle(Natsume, Japan)을 사용하여 경구투여하였다(Table 1).

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	No. of rats	Characteristics
Sham	5	Sham group
Control	7	RA induced control group
I	7	RA induced and OA1
II	7	RA induced and OA2

OA1: Oral Administration with Onion extractor. OA2: Oral Administration with Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor

5. 관절염 지수를 이용한 관절염 평가

관절염 지수 평가는 Wood의 방법을 변형한 Burrai의 방법²⁶⁾에 따라 백서의 각 지점에서 關節 腫脹과 關節 주위 發赤 정도를 육안 관찰하여 0점에서 4점으로 점수를 배점하였다(Table 2).

Table 2. Clinical Evaluation of Arthritis

Grade	Clinical symptom
0	No change
1	Mild swelling and erythema of the mid foot or tarsal bone or the ankle joint
2	Mild swelling and erythema of the mid foot or tarsal bone through the ankle joint
3	Moderate swelling and erythema of the ankle joint through the metatarsal bone
4	Severe swelling and erythema of the ankle joint through the digit

6. 족 부종 체적(paw edema) 변화 측정

Winter 등²⁷⁾의 연구방법을 수정한 것으로 water-displacement 방법에 의하여 유발 전 용적(Volume)을 대조용적(Control volume)으로 하여, 매일 같은 시각에 측정된 용적과의 차이를 비교하였다. 또한 족 부종의 체적측정은 유발 직후, 2주, 4주에 각각 3회 반복 측정하여 평균을 내어 체적(ml)을 산출하였다.

7. 통각역치 측정

1) 기계적 통각 역치 측정(Touch TestTM Sensory Evaluator)
백서는 바닥이 그물 철망으로 된 아크릴 상자(20 × 25 × 13 cm³) 넣고 바닥에서 35 cm 높게 설치한 후 그 아래에 경사거울을 설치하여 동물의 행동반응을 효과적으로 관찰할 수 있도록 하였다. 기계적 자극은 von Frey filaments(North Coast Medical Inc, USA)를 수직 방향으로 세워 관절염을 유발한 족부의 제 3 중족골 부위에 자극하였으며, 1.0, 1.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0 및 26.0g의 bending force를 갖는 von Frey filaments로 각각 5회 자극하여 적어도 3회 이상 능동적으로 발을 회피하는 반응을 유발하는 최소한의 bending force를 찾아서 기계적 자극에 대한 회피

반응 역치(paw withdrawal mechanical threshold: PWT, g)로 하였다. 회피반응은 자극시 발바닥을 들거나, 핥거나, 털거나, 도망가는 현상을 양성반응으로 간주하였다.

2) 열적 통각 역치 측정

열성 통각 역치 측정은 Hot plate(DJM Inc, Korea)를 이용하여 30℃ 온도에서 10분간 적응시킨 후 50℃ 온도로 상승시킨 Hot plate에 백서를 올려놓고 뒷발을 핥거나 또는 뛰는 반응이 나타나는 시간을 측정하였다. 반응 측정은 조직의 손상을 방지하기 위하여 30초 이하로 하였으며, 3회를 측정하여 평균값을 이용하였다. 측정 간격은 유발 직후, 2주, 4주에 측정하였다.

8. 조직학적 검사(Histological assessment)

1) 조직 처리

류마티스 관절염 유발 후 4주째에 전신 마취제인 럼펀(Rompun, 바이엘코리아)을 복강주사(0.6 mg/kg)하여 마취한 후, 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin: NBF)으로 전고정을 실시하였다. 적출된 슬관절을 10% 포름산(Formic acid) 용액에서 탈회(decalsification) 시켰다. 10% 포름산 용액은 1일에 한번씩 교환하면서, 총 10일 동안 탈회를 실시하였다. 그 후 탈회된 슬관절을 세척한 후 10% 중성포르말린용액에서 48시간 동안 후고정을 실시한 후 조직처리과정을 거쳐 자동 포매장치(Tissue-Tex 4701, Sakura Co. Japan)를 이용하여 파라핀 포매한 다음 미세절단기(Sakura 2040, Japan)를 이용하여 5 μm 두께로 박절하였다.

2) 병리조직학적 관찰

박절한 슬관절 절편은 염증침윤 정도를 관찰하기 위해 젤라틴으로 코팅 처리된 슬라이드에 부착시켜 Safranin O-fast green 염색을 실시하였다. 염색하고자 하는 슬라이드를 Xylene에 15분간 반응시켜 탈 파라핀 과정을 거친 후 Weigert's iron hematoxylin 용액에 10 분간 반응시킨 후 10 분간 흐르는 물에 세척하고, fast green (FCF) solution에 5 분간 염색하였다. 1% acetic acid solution에 10 초간 반응시킨 후 0.1% safranin O solution에 5 분간 염색하였다. Safranin O-fast green으로 염색된 슬라이드는 5~10분 정도 충분히 세척하여 핵이 청명한 색이 되도록 하고, 탈수 및 투명과정을 거친 후 봉입하였다. 광학현미경 (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)을 사용하여 각각의 조직절편의 염증 세포의 침윤 정도, 연골과 뼈의 파괴 유무, 세포 파괴 유무를 관찰하였으며, 현미경에 장착된 디지털 CCD 카메라(FOculus, IEEE 1394, Germany)로 각 군의 조직들을 촬영하였다.

9. 면역조직화학 염색

Inflammatory cytokine인 COX-2의 유허관절막내 발현량의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학 염색 방법을 이용하였다. 우선 박절된 슬관절 조직절편을 0.01 M PBS로 여러 번 세척한 후 남아있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 37℃의 온도에서 1% normal blocking serum으로 1시간 처리하였다. 면역화학염색을 위한 전처리과정으로 0.3%의 과산화수소수(hydrogen peroxide) 용액에 30분간 처리하여 조직 내의 내재된 peroxide 활성을 차단

하였다. 다시 0.01 M PBS로 3회 세척한 후 각각의 조직절편을 anti COX-2(N-20, cat# sc-1746, 1:500, Santa Cruz, CA)로 4°C에 overnight 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하고, anti-biotinylated universal secondary(cat# PK-8800, Vectastain, USA)로 2시간 반응시켰다. 다시 0.01 M PBS로 10분씩 3회 수세한 후 Streptavidin/peroxidase(cat# PK-8800, Vectastain, USA)로 30분간 반응시켰으며, 0.01 M PBS로 수세과정을 거쳐 1분간 DAB(3,3- Diaminobenzidine, 60382248, ZYMED Lab, Germany)로 발색을 실시하였다. 0.01 M PBS로 10분씩 3회, 증류수로 10분씩 3회 수세한 후 Hematoxylin(MHS-32, Sigma, USA)으로 대조 염색한 후 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 봉입한 후 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)으로 관찰한 후 현미경에 장착된 디지털 CCD 카메라(FOculus, IEEE 1394, Germany)로 각 군의 조직들을 촬영하였다. COX-2의 발현 정도는 면역조직화학법으로 처리한 조직절편을 광학현미경($\times 100$) 하에서 반정량적 척도(semiquantitative scale)로 구분하여 negative(-), mild(+), moderate(++), severe(+++)로 평가하였다.

10. 통계처리

통계학적 분석은 SPSS 12.0 ver. for Windows®을 사용하였다. 측정값의 사전 정규분포를 확인하기 위해 Levene's test를 실시하였고, 시간에 따른 실험군 간의 통계적 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 사용하였다. 분석 시 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

결 과

1. 관절염 지수를 이용한 관절염 평가

육안적 소견을 바탕으로 관절염 지수를 평가한 결과 다음과 같다(Table 3). 시간에 따른 실험군 간의 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석을 실시한 결과, 모든 측정시기에서 유의한 차이를 나타냈고($p<0.001$), 사후검정을 통한 군간 차이는 모든 측정시기에서 허위군에 대해 대조군은 유의한 차이를 나타냈다($p<0.001$). 1, 14일차에서는 군간 차이를 나타내지 않았으나 28일차에서 대조군과 실험군 II($p<0.001$), 실험군 I 과 실험군 II($p<0.05$)로 각각 유의한 차이를 나타냈다.

Table 3. Effects of Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor on the arthritic index in arthritic rats

Groups	Period(days)		
	1 ^{a)}	14 ^{a)}	28 ^{a)}
Sham	0.20 ± 0.45 ^{b)}	0.00 ± 0.00 ^{b)}	0.20 ± 0.45 ^{b)}
Control	4.14 ± 0.38	3.71 ± 0.49	2.71 ± 0.49
I	4.14 ± 0.38	3.43 ± 0.53	2.00 ± 0.58
II	4.00 ± 0.00	3.29 ± 0.76	1.14 ± 0.69 ^{c,d)}

Values are showed mean±SD. Arthritic model was induced by injected type II collagen and Freund's complete adjuvant(0.1 ml/kg). Control group : group-administered DW 3 ml /1 day to arthritic rats during 28 days, Experimental group I : group-administered Onion extractor 600 mg/3 ml/1 day to arthritic rats during 28 days, Experimental group II : group-administered Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor 600 mg/3 ml/1 day to arthritic rats during 28 days. Tested by one-way ANOVA(a): $p<0.001$ and Tukey's HSD multiple range test, sham-control(b): $p<0.001$, control-group II(c): $p<0.001$, group I-group II(d): $p<0.05$

2. 족 부종 체적(paw edema) 변화 측정

관절염 유발 후 처치에 대한 각 실험군의 족부종 체적 변화 결과는 다음과 같다(Table 4). 시간에 따른 실험군 간의 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석을 실시한 결과, 모든 측정시기에서 유의한 차이를 나타냈고($p<0.001$), 사후검정을 통한 군간 차이는 모든 측정시기에서 허위군에 대해 대조군은 유의한 차이를 나타냈다($p<0.001$). 1일차에서는 군간 차이를 나타내지 않았으나 14, 28일차에서 대조군과 실험군 I ($p<0.001$), 대조군과 실험군 II ($p<0.001$), 실험군 I 과 실험군 II($p<0.001$)으로 각각 유의한 차이를 나타냈다.

Table 4. Effects of Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor on the edema rate in arthritic rats

Groups	Period(days)		
	1 ^{a)}	14 ^{a)}	28 ^{a)}
Sham	14.00 ± 3.81 ^{b)}	3.00 ± 2.00 ^{b)}	1.6 ± 1.52 ^{b)}
Control	133.43 ± 4.12	126.00 ± 4.58	65.29 ± 4.89
I	139.43 ± 5.94	95.42 ± 5.56 ^{c)}	33.86 ± 3.63 ^{c)}
II	139.14 ± 7.67	72.14 ± 5.01 ^{d,e)}	21.57 ± 3.31 ^{d,e)}

Values are showed mean±SD. Other legends are the same as Table 3. Tested by one-way ANOVA(a): $p<0.001$ and Tukey's HSD multiple range test, sham-control(b): $p<0.001$, control-group I (c): $p<0.001$, control-group II(d): $p<0.001$, group I-group II(e): $p<0.001$

3. 통각역치 측정

1) 기계적 통각 역치 측정(Touch Test™ Sensory Evaluator)

관절염 유발 후 처치에 대한 각 실험군의 기계적 통각 역치에 대한 결과는 다음과 같다(Table 5). 시간에 따른 실험군 간의 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석을 실시한 결과, 모든 측정시기에서 유의한 차이를 나타냈다($p<0.001$). 사후검정을 통한 군간 차이는 모든 측정시기에서 허위군에 대해 대조군은 유의한 차이를 나타냈고($p<0.001$), 1, 14일차에서는 군간 차이를 나타내지 않았으나 28일차에서 대조군과 실험군 II($p<0.05$)로 유의한 차이를 나타냈다.

Table 5. Effects of Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor on the change of mechanical stimulus threshold in arthritic rats

Groups	Period(days)		
	1 ^{a)}	14 ^{a)}	28 ^{a)}
Sham	7.20 ± 1.10 ^{b)}	6.40 ± 0.89 ^{b)}	7.20 ± 1.10 ^{b)}
Control	3.71 ± 0.49	3.86 ± 0.38	4.29 ± 0.76
I	4.57 ± 0.96	4.57 ± 0.98	5.14 ± 1.07
II	4.86 ± 1.07	5.14 ± 1.07	6.00 ± 1.15 ^{c)}

Values are showed mean±SD. Other legends are the same as Table 3. Tested by one-way ANOVA(a): $p<0.001$ and Tukey's HSD multiple range test, sham-control(b): $p<0.001$, control-group II(c): $p<0.05$

2) 열적 통각 역치 측정

관절염 유발 후 처치에 대한 각 실험군의 열적 통각 역치에 대한 결과는 다음과 같다(Table 6). 시간에 따른 실험군 간의 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석을 실시한 결과, 모든 측정시기에서 유의한 차이를 나타냈고($p<0.001$), 사후검정을 통한 군간 차이는 모든 측정시기에서 허위군에 대해 대조군은 유의한 차이를 나타냈다($p<0.001$). 1일차에서는 군간 차이를 나타내지 않았으나 14일차에서 대조군과 실험군 II($p<0.05$), 28일차에서는 대

조군과 실험군 II (p<.001), 실험군 I 과 실험군 II (p<.001)로 유의한 차이를 나타냈다.

Table 6. Effects of Onion and Acanthopanax senticosus mixture extractor on the change of heat stimulus threshold in arthritic rats

Groups	Period(days)		
	1 ^{a)}	14 ^{a)}	28 ^{a)}
Sham	8.40 ± 0.55 ^{b)}	9.40 ± 0.55 ^{b)}	13.60 ± 1.34 ^{b)}
Control	3.29 ± 0.49	3.71 ± 0.49	4.14 ± 0.69
I	3.29 ± 0.49	4.43 ± 0.53	5.43 ± 1.40
II	3.43 ± 0.53	5.86 ± 1.77 ^{c)}	8.29 ± 1.11 ^{d,e)}

Values are showed mean±SD. Other legends are the same as Table 3. Tested by one-way ANOVA(a): p<.001) and Tukey's HSD multiple range test, sham-control(b): p<.001), control-group II(c): p<.05, d): p<.05), group I-group II(e): p<.001)

4. 병리조직학적 검사

관절염 유발 후 처치에 대한 슬관절 부위의 관절연골 변화, 활액막, 염증세포 침윤 등에 대한 조직병리학적 관찰 소견은 다음과 같다(Table 7, Fig. 2). 허위군에 비해 대조군은 활액막의 심한 증식과 염증세포가 다수 침윤되어 있고, 활액막이 두터워지고 염증세포들의 많은 침윤이 확인되었다. 양파, 가시오가피 추출물을 투여한 뒤 실험 종료 후 대조군에서는 큰 차이를 보이지 않은 반면, 실험군 I 은 연골회복이 일부 관찰되었으나 일부 활액막에서 만성 염증성 세포의 침윤이 관찰되었다. 실험군 II는 대조군에 비해 연골 회복이 관찰되었고, 염증세포의 침윤이 많이 완화됨을 확인할 수 있었다.

Table 7. Histopathological changes of knee joint of each groups by Safranin O-fast green stain

Groups	Histopathological changes of 28 days			
	edema	synovial cell proliferation	inflammation cell infiltration	cartilage destruction
Sham	-	-	-	-
Control	+++	+++	++	+++
I	++	++	+	++
II	+	+	-	+

-1 : No change, +2 : Mild, +++ : Moderate, ++++ : Severe

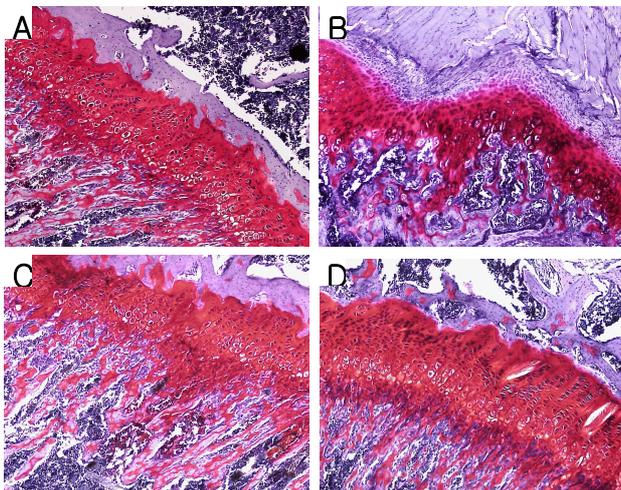


Fig. 2. The rheumatoid arthritis of rat's knee joint(histological observation in rat knee cartilage, safranin O fast green stain, ×100, 28 days, A: sham, B: control, C: group I, D: group II)

5. 면역조직화학 염색(COX-2)

관절염 유발 후 처치에 대한 슬관절 조직에서 발현되는 COX-2에 대한 면역조직화학적 반응 검사 결과는 다음과 같다 (Table 8, Fig. 3). COX-2의 면역반응은 진한 갈색 과립상으로 관찰되며, 주로 윤활관절막 주변부에서 양성 반응을 보이는 세포 수의 증가를 확인할 수 있었다. 실험종료 후 슬관절 조직에서 발현되는 COX-2를 반정량적으로 평가한 결과, 대조군에 비해 실험군 I, II에서 유의한 감소를 관찰할 수 있었고, 특히 실험군 II에서 현저한 감소를 확인할 수 있었다.

Table 8. COX-2 changes of knee joint of each groups by immunohistochemistic stain

Groups	COX-2 immunoreactive cell changes of 28 days
Sham	-
Control	+++
I	++
II	+

-1 : No change, +2 : Mild, +3 : Moderate, ++++ : Severe

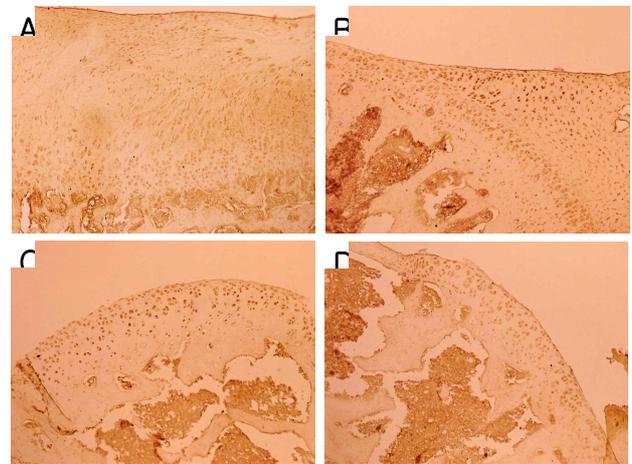


Fig. 3. The Immunohistochemical expression of COX-2 inhibitor in rheumatoid arthritis of rat's knee joint(×100, 28 days, A: sham, B: control, C: group I, D: group II)

고찰

류마티스 관절염은 염증이 주로 골, 연골, 활막 조직의 근접 부위에서 발생하여 주위로 전이되는 형태를 보이며, 과도한 활막 염증조직의 비후는 판누스를 형성하게 되어 염증조직이 활성화됨으로써 주변 골 조직에 침윤되고 활액까지 과급됨으로써 관절 조직 손상, 인대과괴, 인접 근육 손상 등 심각한 기능 이상을 유발하게 된다^{3,4)}. 한의학에서는 류마티스 관절염을 주로 痺證과 關節風으로 표현하며, 痺는 저리며 순환이 안 된다는 의미이고, 關節風은 관절이 붓고 마디마디에 심한 통증을 나타내면서 돌아다니는 의미로 순환장애로 인해 관절에 통증을 나타내는 질환으로 단순한 관절의 염증이라기보다는 전신질환으로 보고 있다.

또한 『黃帝內經』에서 痺證의 의미는 기본적으로 閉寒不痛이며, 廣義로는 臟腑, 器官, 組織의 氣機가 적체되어 발생하는 증상이고, 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 운행을 방해하고 經路의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오

고 부어오르며, 關節의 활동이 不利한 症狀을 의미한다^{10,11,28}). 최근 병인에 대한 분자생물학적 이해가 깊어지면서 새로운 약물과 치료법이 등장하고 있으나 복용을 끊으면 다시 활성화되거나 실제 임상에서 효과가 미비하거나 지속력이 떨어지는 등 문제가 있어 아직 치료제 개발이 미비한 실정이다²⁹). 류마티스 관절염의 약물치료는 크게 소염진통제(NSAIDs), 항류마티스제제(DMARDs), 부신피질 호르몬제 등이 사용되며³⁰, proinflammatory cytokine들의 기능을 차단하거나 anti-inflammatory cytokine들의 기능을 증대시켜 조직의 염증과 파괴를 억제하는 생물학적 제제를 사용하기도 하는데³¹), 각각은 골수부전, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다^{32,33}).

백합과에 속한 양파(*Allium cepa* L.)는 洋蔥으로 불리며 민간에서 祛痰劑, 利尿劑로 사용되었고, 외용으로 사용될 시 創傷, 潰瘍 등의 치료에 사용되었으며²²), quercetin, quercetin-4'-O-glucoside, quercetin-3,4'-O-diglucoside, isorhamnetin, kaempferol conjugates 등과 같은 polyphenolic compounds가 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 성분들은 antioxidative, enzyme-inhibitory, anticancer 등의 효과를 보이는 bioactive compounds로 보고되어 있으나³⁴⁻³⁶) 아직까지 양파의 anti-inflammatory effect에 관해서는 거의 보고된 바가 없다. 오갈피나무과인 속한 가시오갈피나무(*Acanthopanax senticosus* H.)의 근피 혹은 수피인 가시오가피는 우리나라에서 자생하는 관목에서 얻어진 약재로서 辛溫無毒하며 祛風濕, 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있어 肝腎不足으로 인한 腰膝痠痛, 下肢痿弱 등의 병증에 다용되며 溫腎化濕의 작용으로 利水消腫의 효능도 있는 것으로 알려져 있다^{20,21}).

본 연구는 전남 무안이 양파의 주 생산이면서도 공급과 수요 문제로 재배 농가에 안정적인 소득원이 되지 못하고 있는 실정에서 양파를 활용한 가공 음료가 증가되고 있기 때문에 지자체, 업체와 공동으로 관절염에 유의한 가시오가피에 양파를 혼합하여 건강 음료의 개발을 목적으로 실험적 연구를 진행한 것이다. 이에 본 연구자들은 양파 추출물과 가시오가피에 양파를 추출한 혼합물의 효과를 비교 검토하고, 가시오가피에 천연물을 혼합하였을 때 건강 음료로서의 가능성을 확인코자 하였다.

본 실험에 사용된 collagen은 관절연골 교원질의 대부분을 차지하는 물질로 류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되어 연골파괴의 표식자로 이용되고 있으며, 면역학적 조직학적·임상적으로 사람의 류마티스 관절염과 매우 유사하다고 알려져 있어 류마티스 관절염을 연구하는데 많이 활용되고 있다³⁷). 본 연구는 양파, 가시오가피 혼합 추출물의 collagen 유입으로 류마티스 관절염 백서 모델에서의 관절 활막 내 COX-2 단백질 발현 및 염증반응 억제와 관절조직 보호효과를 확인하고자 하였다. 먼저, 육안적 소견을 바탕으로 한 관절염 지수평가에서 부종과 발적에 대한 지수는 1일과 14일차에서는 구간 차이를 나타내지 않았으나 28일차에서 대조군에 비해 실험군 II(p<.001)에서, 실험군 I에 비해서는 실험군 II(p<.05)

에서 유의한 차이로 감소하는 소견을 보였다. 부종은 염증 또는 류마티스 염증의 국소 증상으로 이는 미세혈관계의 투과성 증가와 혈류 속도의 지연 및 혈류량의 증가로 인한 혈장성분, 백혈구의 삼출에 의해 발생하는데³⁸), 본 연구의 즉 부종 체적 변화에서는 14일과 28일차에서 대조군에 비해 실험군 I, II는 각각 유의하게 부종증가를 억제시켰고(p<.001), 실험군 I에 비해서는 실험군 II가 더 유의하게 억제시키는 것으로 나타나(p<.001) 양파와 가시오가피가 항염작용에 의한 혈장이나 백혈구의 삼출을 억제하여 부종 증가를 억제한 것으로 판단된다.

관절염으로 인한 염증성 인자는 신경생리학적, 행동학적 변화를 가져오며, 이는 말초수용영역의 크기 증가, 기계적 자극에 의한 피부와 관절의 민감도 증가로 중추가 감각되며, 행동학적 통각과민 반응을 나타낸다³⁹). 본 연구에서는 진통 효과 검정을 위한 행동반응평가 결과로, 기계적 통각 역치 측정에서는 28일차에서 대조군에 비해 실험군 II가 유의한 차이(p<.05)를 보였고, 열적 통각 역치 측정에서는 14일차에서 대조군에 비해 실험군 II에서 유의한 차이(p<.05)를 보였고, 28일차에서는 대조군에 비해 실험군 II에서 유의한 차이를 보였고(p<.001), 실험군 I에 비해서는 실험군 II가 열적 통각 역치에 더 유의한 것으로 나타나(p<.001) 양파만 투여한 것보다 양파와 가시오가피를 혼합하여 투여한 것이 진통효과에 더 유의한 것으로 나타남을 알 수 있었다. 이는 구심성 신경말단 수용체에 bradykinin과 histamine 등을 자극하여 통증과 함께 감각과민의 상태를 일으켜 부종, 혈관 확장 등의 염증성 반응⁴⁰)을 양파와 가시오가피가 유의하게 억제시킨 것으로 판단된다.

현재 COX는 COX-1, COX-2 두 종류가 밝혀져 있으며, 두 단백질은 분리된 다른 유전자에 의해 발현되는데, COX-1은 정상 생리학적 역할을 하는 프로스타글란딘(prostaglandin, PG)의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있고, 반면, COX-2는 정상 생리학적 조건에서는 발현되지 않으며 성장인자(growth factor), 사이토카인(cytokine), 암발생 촉진 물질(tumor promotor) 등에 의해 빠르게 발현한다⁴¹). COX-2는 염증과 관련된 세포들에 의해 발현되는 것으로 알려져 있고, COX-2 단백질 발현을 조절하는 것이 항염증 작용에 중요한 기전으로 이를 조절할 수 있는 물질에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다^{42,43}). 본 연구에서는 양파, 가시오가피 혼합 추출물을 4주간 경구투여 후 관절면에서의 조직병리학적 변화를 관찰하였다. Issekutz 등⁴⁴)은 관절염 백서의 조직 병리연구에서 다핵 백혈구와 림프구의 침윤이 심하게 나타났다고 보고하였는데, 본 연구에서도 조직 병리학적 검사 결과와 일치하였고, 특히 허위군에 비해 대조군은 뚜렷한 관절 연골 손상과 염증성 활막의 침습으로 염증 침윤 정도 및 관절 파괴가 심하게 나타났다. 반면, 양파 추출물을 투여한 실험군 I은 관절 파괴 및 염증 침윤 정도가 덜 나타났고, 특히 양파, 가시오가피 혼합 추출물을 투여한 실험군 II에서는 그 정도가 매우 약하게 나타났다. 이는 양파의 quercetin 성분의 항염증 반응⁴⁵)과 가시오가피의 항염증 및 진정·진통작용, prostaglandin 생성억제 등^{46,47})이 작용하여 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 양파와 가시오가피 혼합 추

출물은 type II collagen으로 유발된 관절염 백서에 염증반응 및 족부종을 억제시켜 진통작용에 유의한 효과를 보였고, 조직학적으로 연골의 파괴를 억제시켜 관절염으로 인한 염증 개선에 효과를 나타냈다.

결 론

가시오가피와 양파 혼합 추출물이 type II collagen 유발 관절염 모델에 미치는 영향을 알아보기 위하여 부종억제율, 통증에 대한 행동반응, 슬관절의 조직병리학적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

관절염 지수 평가와 족 부종 체적 변화는 실험군 모두에서 대조군에 비해 발작과 부종이 유의하게 감소하였다. 특히 실험군 II는 실험군 I 보다 더 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다.

통증에 대한 행동반응평가에서 기계적 및 열적 통각 역치 반응은 실험군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 특히 실험군 II는 실험군 I 보다 더 유의하게 감소하였다.

조직학적 조건에서 실험군 모두 대조군에 비해 연골의 회복과 염증 세포의 침윤이 완화되었고, 특히 실험군 II가 실험군 I에 비해 더욱 효과적으로 나타났다.

이상의 결과로 미뤄 보아 type II collagen 유발 관절염 백서에서 가시오가피에 양파를 혼합한 추출물은 관절염 염증 소견을 유의하게 개선시키는 것으로 나타났고, 양파만 단독 투여한 실험군 I에 비해 병용 투여한 실험군 II가 보다 유의한 효과가 있는 것으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2009년 중소기업청 산학공동기술개발지원사업에 의해 진행되었음

참고문헌

1. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울, 정담출판사, pp 2148-2157, 2006.
2. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울, 군자출판사, pp 78-99, 2005.
3. Song, Y.W. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. Kor J Medicine, 76: 1-6, 2009.
4. Park, S.H. New diagnostic method of rheumatoid arthritis. Kor J Medicine, 76: 7-11, 2009.
5. Lorig, K., Holman, H. Arthritis self-management studies: A twelve years review. Health Educ Q, 20(1):17-28, 1993.
6. Mun, M.S. A study on pain, discomfort, depression and coping patterns in chronic arthritis patients. J Rheumatol Health, 1(1):71-87, 1994.
7. Kim, I.J., Suh, M.J. The related factors of self-efficacy in patients with Rheumatoid arthritis. J Korean Acad Adult

- Nurs, 11(1):87-95, 1999.
8. 함상근. 류마티스 관절염의 약물치료. 가정의학회지 29: 320-323, 2008.
9. 上海中醫學院編. 內科學(上). 上海, 上海科學技術出版社, pp 234-238, 1983.
10. 鄭錫熙. 痺症의 分類와 治療에 관한 考察. 韓方物理療法學會誌 2: 56-66, 1991.
11. 이운숙, 박지용, 임혜자. 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 NSAIDs의 말초 진통 효과와 Cyclooxygenase-1과 Cyclooxygenase-2의 발현. 대한마취과학회지 47: 862-869, 2004.
12. Cashman, J.N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. Drugs, 52(5):13-23, 1996.
13. Smith, W.L., DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases(cyclooxygenase)-1 and -2. Adv Immunol, 62: 167-215, 1996.
14. Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristimaki, A.P., Sano, H., Remmers, E.F., Epps, H.R., Hla, T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. J Clin Invest, 93: 1095-1101, 1194.
15. 이영호, 최성재, 지종대, 김애리, 김철환, 송관규. 류마티스 관절염 활액막에서 Cyclooxygenase-1, 2의 발현 양상. 대한류마티스학회지 5(2):159-168, 1998.
16. You, J.H., Lee, K.K., Chan, T.Y., Lau, W.H., Han, F.K. Arthritis treatment in Hong Kong--cost analysis of celecoxib versus conventional NSAIDs, with or without gastroprotective agents. Aliment Pharmacol Ther, 16(12):2089-2096, 2002.
17. 윤형란, Michael Corzillius, 김성운, 배상철. 류마티스 관절염 치료 시 비스테로이드성 소염제 단독, 위장관 부작용 예방 약제 병용 투여 및 COX-2 특이 억제제 사용의 한국 비용-효과 분석. 대한내과학회지 60(6):574-588, 2001.
18. Feldman, M., McMahon, A.T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastro-intestinal toxicity? Ann Intern Med, 132(2):134-143, 2000.
19. Cannon, G.W. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors. Drugs Today(Barc), 35(7):487-496, 1999.
20. 신민교. 임상본초학, 서울, 영림사, pp 509-511, 1994.
21. 전국 한의과대학 본초학교수. 본초학, 서울, 영림사, pp 283-284, 1994.
22. 정보섭, 신민교. 鄉藥大事典, 서울, 영림사, pp 155-156, 1990.
23. 임태수, 도정룡, 권오준, 김현구. 반응표면분석을 이용한 양파의 추출효율 및 기능성에 대한 모니터링. 한국식품영양과학회지 36(1):105-110, 2007.
24. 정수진, 부산지역 중년 여성들의 건강기능식품에 대한 인지도 및 섭취실태, 부산대학교 대학원, 2009.

25. 최찬현, 김경윤, 정종길, 정재곤, 정현우. 양파와 가시오가피 혼합 추출액이 비만 흰쥐에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 25(4):596-602, 2011.
26. Trentham, D.E., Dynesius, R.A., Rockin, R.E., David, J.R. Cellular sensitivity to collagen in rheumatoid arthritis. *New Engl J Med*, 299: 327-332, 1978.
27. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(P-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 141: 369-376, 1963.
28. Lee, J.D. Korean Medicine approach to rheumatoid arthritis. *J Kyung Hee Univ Med Cent*, 20: 4-9, 2004.
29. 김창수, 박용기. 우슬(牛膝)의 콜라겐 유도 관절염 생쥐에 대한 개선 효과. *大韓本草學會誌* 25(4): 129-135, 2010.
30. Simon, L.S., Yocum, D. New and future drug therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 39(1):36-42, 2000.
31. 송정수. 류마티스 관절염 치료에서 중앙괴사인자억제제 사용에 대한 고찰. *대한류마티스학회지* 14(1):1-14, 2007.
32. 송영옥. 최근 조명된 류마티스 관절염의 병태생리. *대한내과학회지* 76(1):1-6, 2009.
33. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. *대한침구학회지* 21(4):177-196, 2004.
34. Price, K.R., Bacon, J.R., Rhodes, M.J.C. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glycosides in Onion (*Allium cepa*). *J Agric Food Chem*, 45: 938-942, 1997.
35. Block, E., Gulati, H., Putman, D., You, N., Zhao, S.H. Allium chemistry: Synthesis of 1-[Alk(en)ylsulfanyl]propyl Alk(en)yl disulfides (cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of Onion (*Allium cepa*). *J Agric Food Chem*, 45: 4414-4422, 1997.
36. Chu, Y.H., Chang, C.L., Hus, H.F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric*, 80: 561-566, 2000.
37. 박 원. 류마티스 관절염의 정의와 원인. *의약정보*, 19(3): 29-33, 1993.
38. 김진호, 한태륜. 재활의학. 서울, 군자출판사, p 503, 2003.
39. Sluka, K.A., Westlund, K.N. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain*, 55(3):367-377, 1993.
40. Chen, S.H., Fahmi, H., Shi, Q., Benderdour M. Regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 12(1):R21, 2010.
41. 이동훈, 손동섭, 조대윤, 김범준, 임윤영, 김영희. LPS로 활성화된 Raw 264.7 Cells에서 고삼 뿌리 추출물의 항염증과 항산화 효과. *대한의진균학회지* 15(2):39-50, 2010.
42. Kim, J.Y., Jung, K.S., Jeong, H.G. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett*, 569(1-3):321-326, 2004.
43. Kim, R.G., Shin, K.M., Kim, Y.K., Jeong, H.J., Ha, J.H., Choi, J.W., Park, H.J., Lee, K.T. Inhibition of methanol extract from the aerial parts of *Saururus chinensis* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull*, 26(4):481-486, 2003.
44. Issekutz, A.C., Issekutz, T.B. Quantification and kinetics of polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte accumulation in joints during adjuvant arthritis in rats. *Clin Immunol Immunopathol*, 61(3):436-447, 1991.
45. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents. Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biol Med*, 19: 481-486, 1995.
46. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당. pp 204-205, 2001.
47. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울, 도서출판 신일상사, pp 727-732, 2005.