

## 連山烏鷄가 monosodium iodoacetate로 骨關節炎을 誘導한 랫드에 미치는 影響

심부용<sup>1#</sup>, 최학주<sup>1</sup>, 지중구<sup>2</sup>, 김동희<sup>1,3\*</sup>

1 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터,  
2 : 중부대학교 한방건강관리학과, 3 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실

### Effects of Yeonsan Ogye on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats

Boo-Yong Sim<sup>1#</sup>, Hak-Joo Choi<sup>1</sup>, Joong-Gu Ji<sup>2</sup>, Dong-Hee Kim<sup>1,3\*</sup>

1 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC-RIC), Daejeon University  
2 : Department of Oriental Health Care, College of Oriental Medicine, Daejeon University  
3 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

#### ABSTRACT

**Objective** : The aim of this study is to investigate anti-arthritis activity using a korea's natural monument No. 265 designate 'Yeonsan-Ogye'. In this study, research by using extracts from different concentration of the Yeonsan-Ogye through an MIA-induced arthritis animal model was being conducted in vivo and scientifically verifying the efficacy of medicinal food.

**Methods** : Yeonsan-Ogye was administered 500 mg/kg/day, 1000 mg/kg/day, 2000 mg/kg/day to SD-Rat, where arthritis was induced by monosodium iodoacetate (MIA) at 60 mg/ml. MMP-9, COMP, CTX II, calcitonin and glycosaminoglycan level in serum were measured by ELISA. The changes of relative hind paw weight bearing ratio by Incapacitance Test Meter and The cartilage of meniscus volume was examined and 3-D high-resolution reconstructions of the cartilage of meniscus were obtained using a Micro-CT system. Also, the histopathological analysis of knee was observed by H&E and safranin-O staining.

**Results** : Production of MMP-9, COMP (all groups) and CTX II (500, 1000 mg/kg/day) level in serum was decreased, respectively, in comparison with control. The other way, production of calcitonin (500, 1000 mg/kg/day) and glycosaminoglycan (all groups) level in serum, Hind paw weight bearing ratio (all groups) was increased, respectively, in comparison with control. The cartilage of patella volume in micro-CT increased significantly. In addition, all groups showed a increase in the cartilage volume and proteoglycan.

**Conclusion** : The results for Yeonsan-Ogye showed significant antiarthritis activity in serum and the cartilage. Therefore, it is thought to be that Yeonsan Ogye can be utilized as a variety of new korea medicine and health foods against arthritis diseases.

**Key words** : antiarthritis, medicine food, MIA, osteoarthritis, Yeonsan-Ogye

## I. 서 론

현대사회는 의학 기술의 발달과 생활수준의 향상으로 평균 수명이 연장되어 노인인구의 비율이 날로 증가하고 있다. 국가

\*Corresponding author : Dong-Hee Kim, Daejeon University, Korea.  
· Tel : +82-42-280-2636 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr

#First author : Boo-Yong Sim, Daejeon University, Korea.  
· Tel : +82-42-280-2827 · E-mail : boyish3@naver.com

· Received : 10 February 2017 · Revised : 27 February 2017 · Accepted : 15 March 2017

통계포털 자료<sup>1)</sup>에 의하면, 65세 이상 인구수는 2010년 약 542만 명에서 2015년 약 656만 명으로 증가하였으며, 이와 같은 통계자료는 앞으로 고령화 사회가 빠르게 진행되어 노인성 질환에 대한 문제가 더욱 심각해질 것이라는 전망을 뒷받침하고 있다. 단편적인 예로 대표적인 노인성 질환이라 할 수 있는 골관절염 (Osteoarthritis)에 대한 진료인원은 2011년 약 336만 명에서 2015년 약 376만 명, 총 진료비는 2011년 9,468억 원에서 2015년 11,632억 원으로 점차 증가되고 있음이 보고되었다<sup>2)</sup>.

골관절염은 유전, 연령, 과체중, 관절 외상 등 다양한 원인으로 발생한다고 알려져 있으나, 아직까지도 정확한 원인이 밝혀지지 않아 연골 및 관절 기능 저하로 인한 관절운동 범위 제한과 함께 종창, 통증 등의 증상을 호소하는 환자가 많은 실정이다<sup>3-5)</sup>.

현재 골관절염의 치료를 살펴보면, 약물치료 (소염진통제, 연골 보호제, 비스테로이드성 항염증제 등)과 비약물 치료 (인공관절 치환술)가 주를 이루고 있으나, 약물치료의 경우는 장기간 복용 시 위장관, 심혈관 등의 부작용에 대한 우려가 있고 비약물 치료는 염증 또는 재수술 등의 문제점으로 인해 많은 사람들이 골관절염을 미연에 방지하고자 인대, 건, 근육 등을 튼튼하게 해주는 한약이나 건강보조식품을 활용하고 있는 실정이다<sup>6)</sup>.

한의학에서 골관절염은 鶴膝風, 痺症, 關節風, 脚氣에 속하고 전신의 筋骨, 肌肉, 關節에 발생하며, 痛症, 痠脹感, 麻木, 重着感, 운동장애를 수반하여 祛風濕, 清血熱, 化濕痰 작용을 통해 經脈을 소통시키고 氣血을 조화시키는 방법으로 침, 약침, 뜸, 약물 등으로 치료한다<sup>7,8)</sup>.

한의학의 다양한 치료법 중 골관절염에 대한 국내 실험적 연구를 통해 현재까지 밝혀진 단일 약물은 鹿茸<sup>9)</sup>, 赤小豆<sup>10)</sup>, 向日葵子<sup>11)</sup> 등이 진행되었으며, 대다수가 콜라겐으로 유발한 류마티스 관절염 연구 또는 처방 및 복합물, 약침에 대한 연구가 주를 이루고 있어 단일 약물에 대한 연구는 많은 연구가 진행되지 않았다.

본 연구에 사용된 烏鷄는 《東醫寶鑑 湯液編》에 烏雄鷄肉이라 하여 “性微溫, 無毒, 主心病肚病, 除心腹惡氣, 及風濕痺, 補虛羸, 安胎, 治折傷, 并癰疽”라고 기재되어 있고<sup>12)</sup>, 국내 연구를 통해 생리활성 효능<sup>13)</sup>과 선천 면역 반응 억제<sup>14)</sup>에 관한 연구가 진행되었으나 관절염에 대한 연구는 수행된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 기재된 烏鷄의 효능에 착안하여 MIA로 골관절염을 유발하기 2주전부터 골관절염 유발 후 4주 동안 경구 투여함으로써 관절염에 대한 예방과 치료에 대한 효능을 혈청 내 관절염 유관 인자 및 체중부하 측정, micro-CT, 조직병리학적 검사 등을 통해 확인한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 조제

본 실험에 사용한 연산오계 (Yeonsan Ogye, 이하, YO로 표기)는 지산농원 (Korea)에서 구입 하였고, 분리한 육질 1 kg

에 물 10 L를 넣어 3시간 동안 환류 추출하였다. 이후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 얻은 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 109.8 g (수득율 10.98%)의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

연구에 사용된 시약은 ether (Sigma Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), Rat total MMP-9 quantikine kit (R&D system, U.S.A.), Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) ELISA kit, Rat calcitonin ELISA kit, Rat Cross-Linked C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX-II) ELISA kit, Rat Glycosaminoglycans (GAGs) ELISA kit (MyBioSource Co., CA), MIA : Monosodium iodoacetate (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였으며, 기기는 ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) Incapacitance Test Meter (IITC Life Science, California, U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 3. 동물 및 사료

수컷 6주령의 SD-Rat (170-200 g)을 (주)라운바이오 (Korea)사에서 공급받았고, 동물은 실험 당일까지 일반 고형 사료를 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (동물사용 윤리위원회 승인번호 - DJUAR2016-018)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험 하였다.

### 4. 관절염 유발

2주간의 경구 투여 이후 마취제 (케타민 0.4 ml + 림폰 0.1 ml)로 Rat를 마취하여 오른쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA를 당뇨주사기 (BD Ultra-Fine II Insulin Syringe : BD, U.S.A.)를 사용하여 우측 무릎 관절강 내에 60 mg/ml의 농도로 50 μl씩 투여하였고 MIA 희석시에는 생리식염수 (0.9% saline)를 사용하였다.

### 5. 실험군 분류 및 시료 처리

실험군은 관절염을 유발하지 않은 정상군 (이하, Normal)과 관절염 유발 후 증류수만을 경구 투여한 음성대조군 (이하, Control) 및 관절염 유발 2주전부터 YO를 500 mg/kg/day (이하, 500), 1,000 mg/kg/day (이하, 1000), 2,000 mg/kg/day (이하, 2000)로 경구 투여 한 3개의 실험군 등 총 6개 그룹으로 나누었다. 정상군 6마리를 제외한 나머지 그룹은 각각 10마리씩 분류하고 MIA로 관절염을 유도한 이후 유발되지 않은 동물과 그룹 당 필요한 마릿수인 6마리를 초과한 경우는 동물윤리준칙에 맞추어 안락사를 진행하여 최종적으로 그룹 당 6마리로 실험을 진행하였다.

## 6. 관절염 유관 인자 측정

관절염 유관 인자 측정을 위해 실험 종료 후 심장 채혈하여 분리한 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 통해 다음과 같이 측정하였다.

### 1) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 생성량

96 well plate에 각각의 standard와 control, sample을 50  $\mu$ l를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, washing 작업을 실행한 후 100  $\mu$ l의 Total MMP-9 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 100  $\mu$ l의 substrate solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 37°C incubator에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100  $\mu$ l의 stop solution을 넣어 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 4 parameter logistic curve-fit을 이용하여 계산된 값을 대조군을 기준으로 백분율로 계산하였다.

### 2) C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 및 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP),

#### Calcitonin, glycosaminoglycans (GAGs) 생성량

96 well plate에 50  $\mu$ l의 각각의 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 넣고 100  $\mu$ l의 HRP-conjugate reagent를 추가한 후 1시간 동안 incubator에 넣어 반응시켰다. 이후, washing 작업을 실행한 후 50  $\mu$ l의 chromogen solution A와 B를 순차적으로 넣고 15분 동안 incubator에서 반응시키고 50  $\mu$ l의 stop solution을 넣고 ELISA reader 450 nm 파장에서 측정하였다. 측정결과는 log-log fit을 이용하여 계산된 값을 대조군을 기준으로 백분율로 계산하였다.

## 7. 뒷발 체중부하 측정

실험 종료 직전 Incapacitance Test Meter를 이용하여 측정하였으며, 기기 설치된 플라스틱 케이지에 비스듬히 세운 후, 각 뒷발에 가해진 세기를 10초에 걸쳐 평균 산출하였다. 산출된 결과는 관절염을 유발한 우측 뒷발에 분포된 체중의 백분율을 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산한 뒤 다시 대조군을 기준으로 백분율로 표시하였다.

$$\text{Weight bearing ratio}(\%) = \left( \frac{\text{weight on right hind limb}}{\text{weight on left hind limb}} \right) \times 100$$

## 8. Micro-CT 측정

실험종료 후 우측 무릎 부위를 적출하여 포르말린에 고정 한 뒤 동국대학교 (Korea) 측에 의뢰하여 정면과 측면의 촬영 결과를 3D로 변환하여 연골 부위를 판독하였다.

## 9. 조직병리 검사

Micro-CT가 종료된 조직을 케이피엔티 (Korea)에 H&E 염색과 Safranin-O 염색을 의뢰하였다. 이후 염색된 조직을

광학현미경으로 관찰하여 조직병리 검사를 진행하였다.

## 10. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 평균값±표준 편차 (mean ± S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ).

## Ⅲ. 결 과

### 1. 혈청 내 관절염 유관 인자

#### 1) MMP-9 생성량

실험 종료 후 혈청 내 MMP-9 생성량을 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 MMP-9 생성량이 증가하였다. 하지만, YO 투여군은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 1).

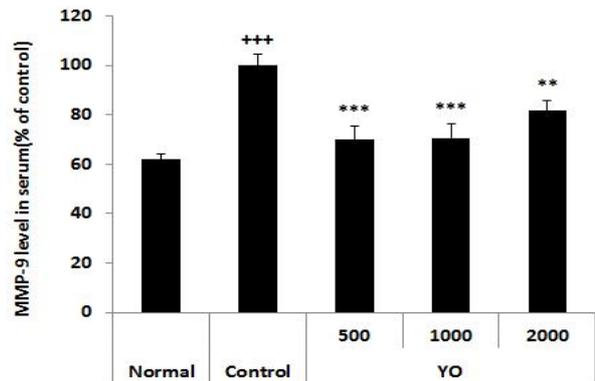


Fig. 1. Effects of YO on levels of MMP-9 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat.

The results were expressed as mean ± S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ :  $p < 0.001$ ) or control and YO groups (\*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ ) based on ANOVA with student's t-test determined.

#### 2) COMP 생성량

실험 종료 후 혈청 내 COMP 생성량을 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 COMP 생성량이 증가하였다. 하지만, YO 투여군은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 2).

#### 3) CTX II 생성량

실험 종료 후 혈청 내 CTX II 생성량을 측정한 결과, 대조군과 정상군의 그룹간의 차이가 나타나지 않았다. 하지만, YO 투여군은 대조군에 비해 500과 1000 실험군에서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 3).

#### 4) Calcitonin 생성량

실험 종료 후 혈청 내 calcitonin 생성량을 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 calcitonin 생성량이 감소하였다. 하지만

YO 투여군은 대조군에 비해 500과 1000 실험군에서 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 4).

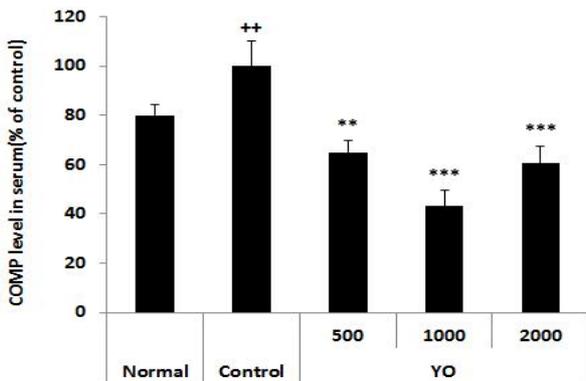


Fig. 2. Effects of YO on levels of COMP in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between normal and control groups (++ :  $p < 0.01$ ) or control and YO groups (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) based on ANOVA with student's  $t$ -test determined.

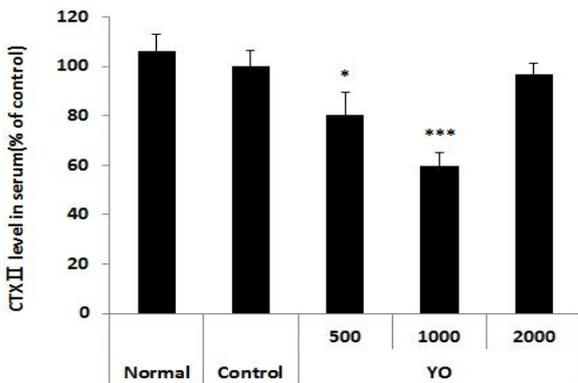


Fig. 3. Effects of YO on levels of COMP in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between control and YO groups (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) based on ANOVA with student's  $t$ -test determined.

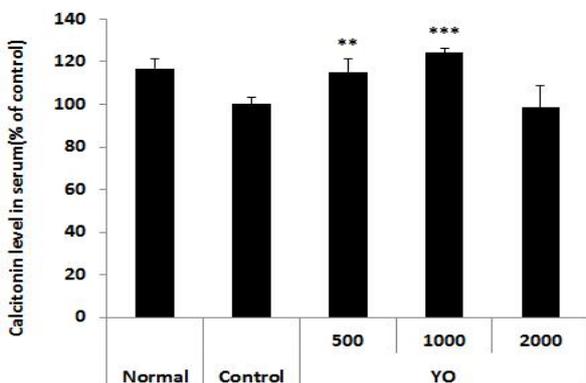


Fig. 4. Effects of YO on levels of calcitonin in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between control and YO groups (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) based on ANOVA with student's  $t$ -test determined.

### 5) Glycosaminoglycan 생성량

실험 종료 후 혈청 내 glycosaminoglycan 생성량을 측정된 결과, 대조군은 정상군에 비해 glycosaminoglycan 생성량이 감소하였다. 하지만 YO 투여군은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 5).

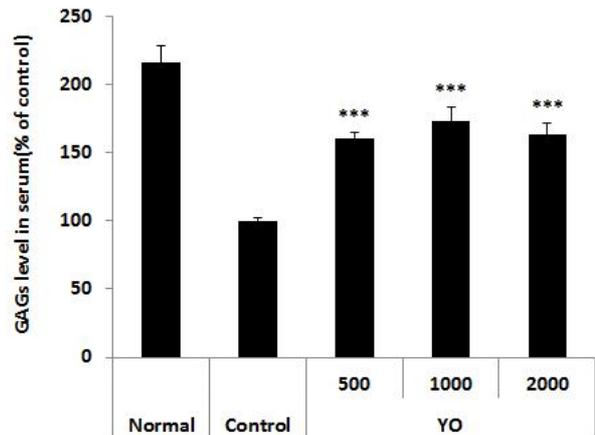


Fig. 5. Effects of YO on levels of glycosaminoglycan in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between control and YO groups (\*\*\* :  $p < 0.001$ ) based on ANOVA with student's  $t$ -test determined.

## 2. 뒷발 체중 부하 측정

실험 종료 직전 뒷발 체중 부하를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 체중 부하 비율이 감소하였다. 하지만 YO 투여군은 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 6).

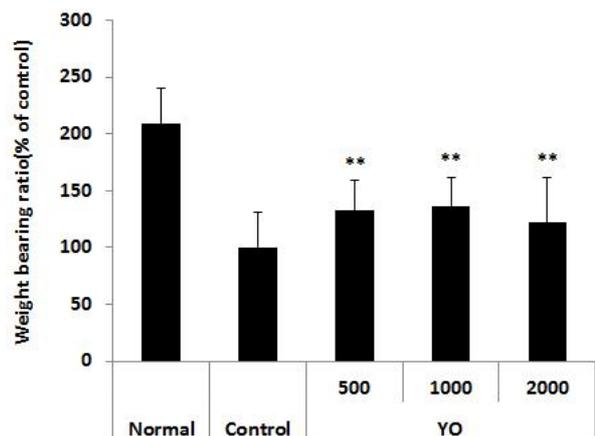


Fig. 6. Effects of YO on weight bearing ratio in the hind paw of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from 6 osteoarthritis rats. The statistical significance of differences between control and YO groups (\*\* :  $p < 0.01$ ) based on ANOVA with student's  $t$ -test determined.

## 3. Micro-CT

실험 종료 후 무릎 관절을 micro-CT로 정면과 측면을 촬

영한 결과, 정상군에 비해 대조군과 YO 투여군의 연골 양 (Cartilage volume, 노란색 원형표기)이 감소되었고 대퇴골 하단 부위에 골의 부식과 파괴가 된 것이 확인되었으나 상대적으로 YO 투여군이 대조군에 비해 연골 양뿐만 아니라 골의 부식과 파괴가 적게 일어난 것이 관찰되었다(Fig. 7-A, B).

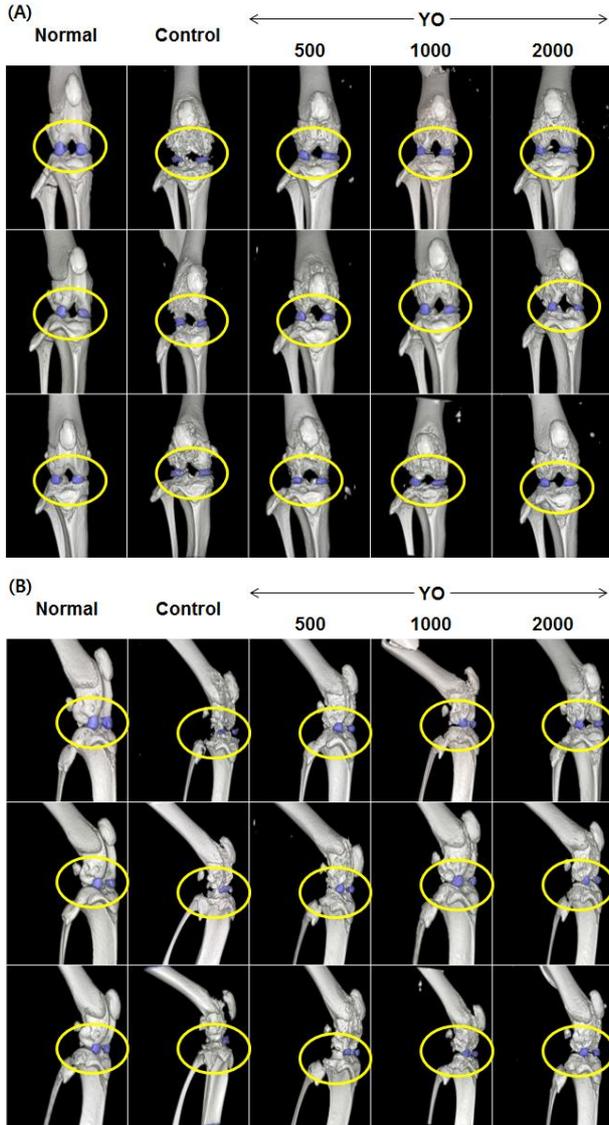


Fig. 7. Effects of KV on imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of MIA-induced osteoarthritis rat, (A); front picture, (B); side picture

#### 4. 조직 병리 검사

##### 1) H&E 염색

무릎 관절의 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군과 YO 투여군은 대퇴골과 경골 사이의 연골 (Cartilage, 노란색 원형 표기)이 많이 감소된 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로 YO 투여군이 대조군에 비해 연골 양이 더 보존되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 대조군과 YO 투여군은 정상군에 비해 연골 주변으로 침윤세포가 많이 생성되어 있는 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로 YO 투여군이 대조군에 비해 침윤세포의 범위나 밀집도가 적은 것이 확인되었다(Fig. 8).

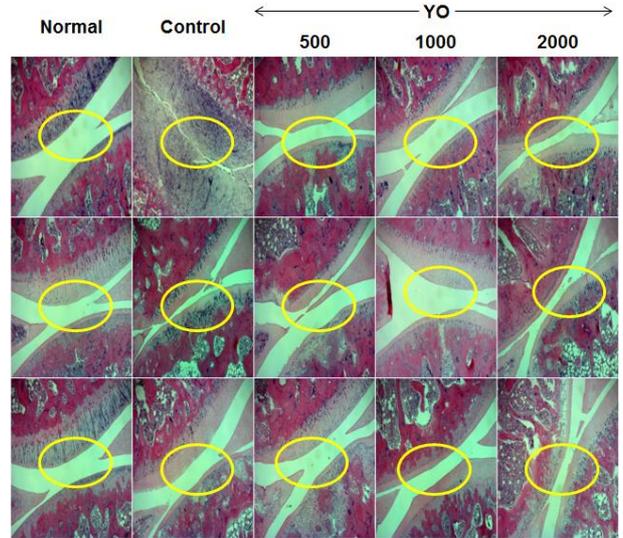


Fig. 8. Effects of YO on joint pathology (Hematoxylin & Eosin staining) from joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Histology in the knees were observed using a visible-light microscope at a magnification of 200X.

##### 2) Safranin-O 염색

무릎 관절의 Safranin-O 염색을 실시한 결과, 정상군에 비해 대조군과 YO 투여군은 연골 주변과 활막 내에 붉은 색으로 염색된 proteoglycan (노란색 화살표)이 고르게 형성되어 있지 않은 것을 확인할 수 있었으나 대조군은 proteoglycan이 소실된 개체를 보인 반면, YO 투여군은 연골 주변과 활막 내 proteoglycan의 분포가 많은 것이 확인되었다(Fig. 9).

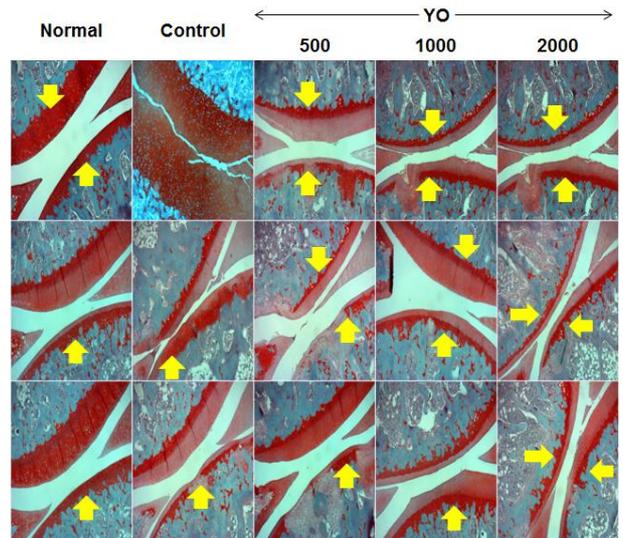


Fig. 9. Effects of YO on joint pathology (Safranin-O staining) from joint of MIA-induced osteoarthritis rats. Histology in the knees were observed using a visible-light microscope at a magnification of 200X.

## IV. 고찰

골관절염은 주로 고관절, 손가락, 무릎 등 장기간 지속적인 사용을 하는 관절 부위에 발생하며, 연골뿐만 아니라 인대,

근육, 활액 등 관절을 구성하는 요소들로 인해 더욱 심화되어 심한 통증을 수반한 채 관절의 운동범위를 제한하게 된다.

이와 같은 골관절염은 특정 연령대에서 발생하는 대표적인 퇴행성 질환으로 인식 되었으나, 과체중, 외상, 염증 반응 등 다양한 발생 원인이 많은 연구를 통해 밝혀짐에 따라 현재는 사회적인 손실을 가져다주는 관절의 만성 질환으로 인식되고 있다. 이로 인해 효과적인 골관절염 치료에 대한 관심이 사회적으로 고조되고 있으나, 관절염 발병 후 NSAIDs, 아세트아미노펜, COX-2 억제제 등의 약물 치료는 아직도 한계점을 발생하고 있고 보조 장치, 대체 요법, 통증 관리 등의 보조적 치료는 골관절염 질환에 직접적인 영향을 줄 수 없어 관절염을 미리 예방하고 치료 할 수 있는 안전하고 효과적인 약물 확보에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>15)</sup>.

한의학에서 관절염은 痹病 중 하나로 風寒濕三氣가 침범하여 氣血의 운행을 방해하고 經絡의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 부자연스러운 증상으로 인해 補肝腎, 強筋骨, 祛風濕, 活血祛瘀 등의 치료법을 사용한다<sup>3)</sup>.

본 연구에 사용된 연산 오계는 천연물 제265호에 지정되어 있으며, 《東醫寶鑑 禽獸編》에 “骨必黑, 乃眞烏鷄也”로 기재된 뼈까지 검은 우리나라의 전형적인 재래 닭으로 寒濕痹의 증상의 치료와 더불어 補虛羸, 安胎, 癰疽, 折傷, 中風 등의 다양한 증상을 치료하는 治療劑로 활용된다<sup>12)</sup>.

이에 본 저자는 문헌적 근거와 함께 이전 실험적 연구결과<sup>13,14)</sup>를 통해 밝혀진 항산화, 항염증 및 선천면역 반응 억제에 대한 유의적인 결과에 착안하여 노화와 염증에 의해 발병되는 대표적 질환인 골관절염에 대해 활용성을 제고하고자 하였다. 이에 따라 랫드 동물모델에게 관절염을 유발하기 2주 전부터 MIA로 관절염을 유발한 후 4주 동안 경구 투여 독성 한계 용량인 2,000 mg/kg을 최고 농도로 설정하여 1,000 mg/kg, 500 mg/kg 등 3개의 농도로 연산 오계를 각각 경구 투여하고 골관절염 유관 인자 및 체중부하 측정, micro-CT, 조직병리 검사를 진행하여 골관절염에 대한 예방 및 치료제로써의 효능을 확인하였다.

골관절염은 관절연골의 소실 및 골 파괴 증상을 동반하게 되는데 단백질 분해효소로 알려진 matrix metalloproteinase (MMP)-9은 생체에서 관절 주변의 콜라겐 파괴로 인해 proteoglycan을 감소시킴에 따라 연골의 변화와 마모로 인해 제 2교원질 조각인 Collagen type II (CTX II)와 같은 세포 외 기질의 농도가 혈액에서 증가하게 된다<sup>16)</sup>. 이와 같은 원인으로 골 손실이 지속되면 연골에 포함된 단백질 성분이 떨어져나가 혈액 내에서 순환하게 되어 혈액 내 COMP 생성량이 증가한다<sup>17)</sup>. 특히, 연골 마모 정도를 측정하는 지표로 알려진 CTX II의 농도의 증가는 무릎에서는 6배, 고관절에서는 8배 이상의 골관절염이 빠르게 진행된다는 연구결과<sup>18)</sup>가 있어, 관절염 발생에 대한 지표로써 중요하다고 할 수 있다. 본 연구 결과, 연산오계 투여군은 대조군에 비해 MMP-9, CTX II (500, 1000 mg/kg/day) 투여군, COMP 생성량이 유의성 있게 감소하여 관절 연골 및 골 파괴를 방어하는 것으로 나타났다.

연산오계 투여가 골관절염을 악화시키는 요인을 감소시킴에 따라 골 형성에 도움을 주는 골 대사 지표들을 확인하고자 calcitonin과 glycosaminoglycan 등의 생성량을 확인하였다.

Calcitonin은 칼슘의 손실을 예방하고 치료하는 호르몬으로써 갑상선에서 분비되어 혈중 칼슘을 빠르게 유입하는 작용을 하며, glycosaminoglycan은 관절 연골의 주요 성분인 proteoglycan을 형성하고 관절연골에 탄력성을 제공한다<sup>19, 20)</sup>. 본 연구 결과, 연산오계 투여군은 대조군에 비해 calcitonin (500, 1000 mg/kg/day) 투여군과 glycosaminoglycan 생성을 정상군에 가깝게 증가시켜 골 강화에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

이와 같은 골 파괴 및 강화 등의 골 대사 인자의 유의적인 혈액학적 결과는 실험 종료 직전 실시한 뒷발 부하 측정결과에서 확인되었으며, 더불어 micro-CT 및 조직병리 검사를 통해 연산오계 투여군이 대조군에 비해 연골 및 proteoglycan의 보존이 잘 되었고 동시에 골 파괴가 적게 일어난 결과들은 골관절염 예방과 개선에 효능이 있음을 더욱 뒷받침하고 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 연산오계는 전임상 실험을 통해 혈액 및 방사선, 조직학 등 다양한 골관절염 유관 인자에 대한 효능이 과학적으로 입증되었다. 다만, 다양한 연산오계 투여 용량 중 농도 의존적이지 않은 2000 mg/kg/day의 결과는 약물의 주된 흡수 경로인 소화관에서 다양한 변화를 통해 흡수율이 저해되어 나타난 결과로 판단되는 바 연산오계의 1000 mg/kg/day 용량이 가장 효과적인 것으로 생각된다. 또한, 연산오계가 현재 천연기념물 지정되어 있어 사육의 개체 수 제한과 저수익성으로 인해 수요가 적다는 한계점이 있지만<sup>13)</sup>, 본 연구결과를 바탕으로 임상연구 결과가 보완된다면 연산오계는 골관절염에 대한 예방과 치료 효능을 가진 약용자원으로써 처방, 약침 등의 한의학적 신규 치료제와 죽, 음료 등의 건강기능성 식품 소재로 활용될 수 있다고 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 연산오계 (YO)의 골관절염에 대한 예방 및 치료 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 골관절염을 유발하기 2주전부터 MIA로 관절염을 유발 후 4주동안 YO를 500, 1000, 2000 (mg/kg/day) 용량을 투여한 후 혈액 내 관절염 유관인자 및 체중부하 측정, micro-CT, 병리조직검사 등을 각각으로 확인한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. YO 투여군은 혈액 내 골 손실 인자인 MMP-9, COMP 생성량을, CTX II 생성량은 500, 1000 (mg/kg/day) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
2. YO 투여군은 혈액 내 골 형성 인자인 glycosaminoglycan 생성량을, 500, 1000 (mg/kg/day) 투여군은 calcitonin 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다.
3. YO 투여군은 체중부하 측정 시 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다.
4. YO 투여군은 micro-CT 촬영 결과, 대조군에 비해 연골 양 및 골 파괴가 적게 나타났다.
5. YO 투여군은 H&E 및 safranin-O 염색을 통한 조직

병리 검사에서 대조군에 비해 연골과 proteoglycan의 보존이 잘 되었다.

이상의 결과들로 보아 연산오계는 골관절염 동물 모델을 통해 혈액 내 골 손실 및 골 형성 인자의 효능이 체중부하 측정, micro-CT, 조직 병리 결과를 통해 규명되다. 전체적인 결과에서 1000 mg/kg/day의 투여가 가장 뛰어난 효능이 나타나 추후 임상적으로 엄격한 기준을 충족한 연구 진행 시 기초적 자료로 활용될 수 있으며, 연산오계가 골관절염에 대한 예방과 치료를 위한 소재로 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

1. Korean Statistical Information Service. 2017. Available from : URL : [http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList\\_01List.jsp?vwcd=MT\\_ZTITLE&parentId=D#SubCont](http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList_01List.jsp?vwcd=MT_ZTITLE&parentId=D#SubCont).
2. Health insurance review & assessment service. Information. 2016 : 1-11.
3. Korean College of Rheumatology. KCR textbook of rheumatology. Seoul: Koonja, 2014 : 275-8.
4. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Oriental rehabilitation medicine, 2nd revision. Seoul: Koonja, 2005 : 84, 97.
5. Couture RR, Cuello AC. Studies on the trigeminal antidromic vasodilatation and plasma extravasation in the rat. *The Journal of physiology*. 1984 ; 346(1) : 273-85.
6. 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. *The Korea Journal of Herbology*. 2014 ; 29(4) : 45-52.
7. Lee YE, Lee YK, Kim JS, Lee HJ. Effects of Clematidis Radix Pharmacopuncture on MIA induced Osteoarthritis Rat. *The Acupuncture*. 2016 ; 33(2) : 35-49.
8. Korean Acupuncture & Moxibustion Society. *The Acupunctre and Moxibustion Medicine*. Seoul: Jibmoondang. 2012 : 507-9, 518-22.
9. Kim JM, Han SW, Lee SH, Moon SH, Park PJ, Lee CH, Yeon SJ, Oh MR, Dang OK, Jung WR. Therapeutic effect of velvet antler and methyl sulfonyl methane (MSM) on osteoarthritis. *Journal of Antier Science*. 2015 ; 1(2) : 93-9.
10. Jeong SH, Kim SH, Kim HK, Yun BR, Lee HW, Lim JH, Rho MC, Kim DH. Effect of Vigna anugularis ethanol extract on papain-induced arthritis in mice. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2012 ; 26(5) : 665-71.
11. Seo BI, Byun BH. A efficacy of Helianthi Annui Semen (sunflower seed) on analgesic effect, anti-inflammation and arthritis. *The Korea Journal of Herbology*. 2002 ; 17(1) : 55-64.
12. Heo J. *DongEuiBoGam*. Seoul : BubInBooks. 2007 : 1065, 1858-9.
13. Kim JW, Sim BY, Choi HJ, Lee HJ, Kim DH. The Study on Biological Activities of Yeonsan Ogye listed on Dong-ui-bo-gam. *The Korea Journal of Herbology*. 2015 ; 30(5) : 23-8.
14. Choi HJ, Sim BY, Joo IH, Yoo SK, Kim DH. Study of Innate Immunity Suppression of Yeonsan Ogye listed on Dong-eui-bo-gam. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2016 ; 30(4) : 236-41.
15. Yoon CH. Osteoarthritis update. *The Korean Journal of Medicine*. 2012 ; 82(2) : 170-4.
16. Kim HW, Choi, JB. Effects of bee venom and Cervi cornu parvum pharmacopuncture in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat. *The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine*. 2010 ; 20(1) : 61-77.
17. Sharif M, Saxne T, Shepstone L, Kirwan JR, Elson CJ, Heinegård D, Dieppe PA. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Rheumatology*. 1995 ; 34(4) : 306-10.
18. Reijman M, Hazes JM, Bierma-Zeinstra SM, Koes BW, Christgau S, Christiansen C, Uitterlinden AG, Pols HA. A new marker for osteoarthritis: cross-sectional and longitudinal approach. *Arthritis & Rheumatism*. 2004 ; 50(8) : 2471-8.
19. Stashak TS. *Adams' lameness in horses*. Verlag : M. & H. Schaper. 2008 : 113-83.
20. Kim BS, Choi HI. Effect of Intra-articular Injection of Sodium Hyaluronate and Polysulfated Glycosaminoglycan in Equine Degenerative Joint Disease. *J Vet Clin*. 1991 ; 8(1) : 11-26.