

MIA로 골관절염 유발된 동물모델에서 山茱萸 30% Ethanol 추출물의 개선 효과

김민주^{1#}, 이진아¹, 신미래¹, 박해진², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

2 : 대구한의대학교 산학협력단 DHU 바이오융복합시험센터

Improvement Effect of Corni Fructus 30% Ethanol Extract by MIA-Induced Osteoarthritis Animal Model

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

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

2 : DHU Bio Convergence Testing Center, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The objective of this study was to investigate the therapeutic effect of Corni Fructus 30% ethanol extract (CFE) on the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats.

Methods : The subjects were divided into 4 groups ; Normal group (N, n=10), MIA-induced osteoarthritis control group (Con, n=10), indomethacin 5 mg/kg treated group (INDO, n=10), CFE 200 mg/kg treated group (CFE, n=10). Blood and articulation tissues were collected after two weeks of drug administration. Oxidative stress was analyzed with reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (ONOO-). And the Nuclear factor erythroid-2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), Nuclear Factor Kappa B p65 (NF- κ Bp65), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-6 (IL-6), Interleukin 1 β (IL-1 β), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) were investigated by western blot.

Results : The administration of CFE showed a significant reduction of changes in relative hind paw weight distribution. Reactive oxygen species (ROS) and peroxy nitrite (ONOO-) levels of articulation tissues were significantly decreased in CFE compared to the control group. Western blot measurements of Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2 showed that the CFE group was increased compared to the Con group. And western blot measurements of NF- κ Bp65, COX-2, iNOS, TNF α , IL-6, IL-1 β showed that the CFE group was reduced compared to the Con group. Also CFE group decreased MMP-1 and increased TIMP-1.

Conclusion : Based on the above results, it can be seen that osteoarthritis is improved when Corni Fructus 30% ethanol extract treated.

Key words : Corni Fructus, Osteoarthritis, monosodium iodoacetate (MIA), Oxidative stress, anti-oxidant, Inflammation, MMP, TIMP

*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 : 11 Dec 2019 · Revised : 21 Jan 2020 · Accepted : 25 Jan 2020

I. 서 론

골관절염(osteoarthritis)은 관절을 보호하는 연골의 손상이나 퇴행성 변화로 인하여 관절을 이루고 있는 인대와 뼈 등에 손상이 일어남에 따라 통증이나 염증 증상이 나타나는 만성 골관절염 질환으로 알려져 있으며, 일반적으로 강직, 근육경련, 통증이나 부종 등의 증상이 나타나고 그 원인으로는 감염, 외상, 퇴행성 변화, 면역계 이상, 대사 장애 등이 알려져 있다^{1,2)}.

골관절염의 유발률은 고령일수록 높아지고 있으며, 현재 우리나라는 고령화 사회를 넘어 고령 사회로 넘어가는 추세이기에 골관절염의 치료를 위한 지속적인 연구가 필요한 상황이다³⁾. 현재 골관절염의 치료제로는 이부프로펜과 나프록센 등의 비스테로이드성 소염진통제와 다양한 스테로이드제들이 사용되지만⁴⁾, 복용을 오래할 경우 심혈관, 위장관과 같은 부작용들로 인한 문제점들이 있다고 알려져 있다⁵⁾.

한의학에서 관절염은 關節痺證에 해당하는 질환 중 하나로 風寒濕의 三氣가 들어와 氣血의 흐름을 막고 經絡의 운행을 방해하여 肢體不利해지고, 腫脹, 麻痺 등의 증상들이 나타나고, 치법으로는 強筋骨, 祛風濕, 活血祛瘀를 사용한다^{4,6)}.

Monosodium iodoacetate (MIA)는 투여 농도에 따라 여러 수준으로 관절의 기능장애와 퇴화를 유발할 수 있고, 그렇게 유발된 관절의 퇴행된 수준에 따라서 통증 정도를 평가할 수 있다고 알려져 있다⁷⁾.

山茱萸 (Corni Fructus)는 층층나무과에 속하는 산수유나무 (*Cornus officinalis* Siebold & Zucc.)의 열매살로, 가을에 성숙한 붉은빛의 열매를 씨를 제거하고 건조한 과육을 山茱萸라 한다⁸⁾. 山茱萸에는 타닌 (tannin), 코르닌 (cornin), 모로니사이드 (morroniside), 로가닌 (loganin), 사포닌 (saponin) 배당체와 사과산, 주석산, 포도주산 등의 유기산이 함유되어 있으며, 그 외에 비타민 A와 다량의 당도 함유되어 있다⁹⁾.

山茱萸의 약리작용으로는 함압, 이뇨, 항균작용, 혈압강하 등이 알려져 있으며, 특히 山茱萸 종자의 물 추출물의 항히스타민 효과, 항당뇨 효과, 항산화 효과, 항균효과 등이 알려져 있으며 山茱萸의 주요 화학 성분에 대한 연구가 보고되어져 있다¹⁰⁾. 하지만 아직 山茱萸가 골관절염에 미치는 영향에 대한 연구는 알려진 바가 없다.

이에 본 연구는 MIA로 골관절염이 유발된 동물모델에서 산화적 스트레스 소거능과 웨스턴 분석을 통하여 山茱萸 30% ethanol 추출물의 골관절염 치료효과를 연구하였고, 유의성 있는 결과를 나타내었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

7주령의 Sprague-Dawley (SD) 체중 180~220 g의 웅성 흰쥐를 하나바이오테크 (경기, 한국) 에서 구매하여, 고형사료 (조단백질 18% 이상, 조지방 8.0% 이하, 칼슘 0.55% 이상, 조지방 5.0% 이상, 칼슘 1.0% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 인 0.85% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 마그네슘 0.15% 이상

NIH-41, Zeigler Bros, Inc., USA)와 물을 충분히 공급하며 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 명암 주기는 습도 50 ± 5%, 12시간 주기, 온도 22 ± 2℃로 조절하였다. 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2019-048)을 얻어 실험을 진행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

2. 시료 추출

본 실험에서는 山茱萸 (CF: Corni Fructus) 300 g에 30% ethanol 3 L를 가하여 열탕 추출기를 사용하여 2시간 열수 추출을 시행하였다. 추출물을 여과한 후 감압 추출장치로 농축하였다. 농축 후 동결 건조기에서 완전히 건조시켜 24.9 g의 파우더를 얻었으며 수율은 8.3%였다. 얻은 파우더를 냉동 (-80℃) 보관하여 실험 직전에 사용하였으며 이를 CFE (Corni Fructus 30% ethanol extract)라고 하였다.

3. 시약

본 실험에 사용된 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD-1), catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), nuclear factor-kappa B p65 (NF-κBp65), inhibitor of κBα (IκBα), phosphorylated inhibitor of κBα (p-IκBα), cyclooxygenase 2 (COX-2), Inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), histone, β-actin 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 1차 항체는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) 구입하였으며, indomethacin, 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dithiothreitol (DTT), potassium persulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), monosodium iodoacetate (MIA)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위하여 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였으며, Protease inhibitor mixture, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

4. 항산화 효능 평가

1) DPPH free radical 소거능 측정

추출물의 항산화 효능을 측정하기 위해 Blois법¹¹⁾에 의한 DPPH free radical 소거법을 사용하였다. 0.2 mM DPPH용액 100 μL와 추출물을 농도별로 희석한 용액 100 μL를 혼합하여

30분간 암소상태로 방치한 후 540 nm에서 측정하였다. L-ascorbic acid을 표준물질로 사용하였으며, 추출물을 넣지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소하는데 필요한 추출물의 양을 IC₅₀ 값으로 표시하였다. 흡광도는 아래의 식을 사용하여 산출하였다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH Radical scavenging activity (\%)} \\ & = \{(\text{ODcontrol} - \text{ODsample}) / \text{ODcontrol}\} \times 100 \\ \text{ODcontrol} & : \text{시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도,} \\ \text{ODsample} & : \text{시료가 들어간 경우 흡광도.} \end{aligned}$$

2) ABTS free radical 소거능 측정

추출물의 항산화 효능을 측정하기 위해 ABTS free radical 소거능을 측정하였다¹²⁾. 2.4 mM의 potassium persulfate와 7 mM ABTS용액을 혼합하여 실온에서 차광한 상태에서 약 16시간 이상 ABTS+을 형성시킨 후 사용하였다. 415 nm, 30°C에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 이 되게 ethanol로 희석한 ABTS 용액 95 μL 에 시료 5 μL 를 가하여 15분간 반응시킨 후 415 nm, 30°C에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 흡광도는 아래의 식을 사용하여 산출하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS Radical scavenging activity (\%)} \\ & = \{(\text{ODcontrol} - \text{ODsample}) / \text{ODcontrol}\} \times 100 \\ \text{ODcontrol} & : \text{시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도,} \\ \text{ODsample} & : \text{시료가 들어간 경우 흡광도.} \end{aligned}$$

5. 골관절염 효능 평가

1) 골관절염 유발

골관절염 유발을 위하여 실험동물의 오른쪽 무릎의 주변 털을 깨끗하게 제거한 후, 0.9% saline으로 희석한 MIA (monosodium iodoacetate)를 0.3 mL insulin syringe를 사용하여 무릎 관절강 내에 50 μL (80 mg/mL)씩 주입하여 골관절염을 유발하였다.

2) 군 분리 및 약물투여

MIA로 골관절염 유발 1주일 후 뒷다리 체중 부하 검사를 통해 골관절염이 유발된 실험동물을 각 군당 10마리씩 4 group으로 구분하여 실험을 진행하였다. 실험군은 골관절염을 유발하지 않은 정상군 (N), 골관절염 유발 후 약물처치를 하지 않은 대조군 (Con), 유발 후 indomethacin을 5 mg/kg로 투여 해주는 양성대조군 (INDO), 유발 후 山茱萸 30% ethanol 추출물을 200 mg/kg로 경구 투여한 약물처리군 (CFE)으로 2 주간 약물투여를 진행하였다.

3) 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 전자체중계를 이용하여 2일에 한번 동일 조건에서 측정하였고, 식이섭취량은 제공된 사료에서 2일간 섭취 후 남아있는 사료의 양을 측정하여 각 실험군의 하루 사료 섭취량을 계산하였다.

4) 뒷다리 체중 부하 측정

MIA로 골관절염을 유발하기 하루 전, 유발 1주 후, 투여 1주 후, 투여 2주 후에 측정하였다. Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., UK)를 이용하여 뒷다리 양쪽의 부하 무게를 측정하였다. 뒷다리 체중 부하 측정 결과는 MIA로 골관절염이 유발된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량에 정상적인 왼쪽 뒷다리 부하량을 계산하여 체중 부하 비율을 구하였다. 정상군의 체중 부하 비율에 각 군의 체중 부하 비율을 계산한 후 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 아래의 식을 사용하였다.

$$\begin{aligned} \text{I} \text{ 체중부하비율} & = \frac{\text{정상뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}} \\ \text{II} \text{ 상대적 체중 부하} & = \frac{\text{각군의 체중 부하비율}}{\text{정상군의평균 체중 부하비율}} \times 100 \end{aligned}$$

5) 산화적 스트레스 바이오마커 측정

관절조직 내의 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 485 nm에서 5분씩 간격을 두어 0분부터 30분간 측정된 값을 통해 산출하였다¹³⁾. 그리고 ONOO-를 측정하기 위하여, Kooy 등의 방법을 시행하여 측정하였다¹⁴⁾. 각 샘플을 pH 7.4의 rhodamine buffer와 5mM DHR123과 섞은 후 5분간 37°C에서 흔들여 준 후 5분 간격으로 emission wavelength of 535 nm와 excitation wavelength of 480 nm를 이용하여 0분부터 30분간 측정하여 나온 값을 통해 산출하였다.

6) 관절조직 Western blotting

2주간 투여가 끝난 뒤 오른쪽 무릎 부위를 절단하여 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail, 0.1 M DTT, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM CaCl₂,를 첨가시킨 buffer A를 넣은 후 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄하여 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 이후 ice 위에서 20분간 정치시킨 후, 12,000 rpm으로 2분간 원심분리시켜 세포질을 포함한 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 상층액을 따고 남은 물질에 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μL 의 buffer C (50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재 부유시킨 후 10분간격으로 vortex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관 하였다. 세포질 내의 MMP-1, TIMP-1, iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α , β -actin 등의 단백질 발현을 측정하기 위해 10 μg 의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 다음, membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음

PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석 후 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, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 해당 band를 정량하였다.

6. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후검정을 실

시하여 각 군 간의 평균차이에 대한 통계적 유의성을 p -value < 0.05에서 검증하였다.

II. 결 과

1. DPPH 및 ABTS free radical 소거능 측정

CFE의 항산화능을 측정하기 위해 DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 측정하였다. DPPH free radical 소거능 측정 결과, CFE의 IC₅₀ 값은 34.10 ± 3.35 , 표준물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.66 ± 0.01 으로 측정되었다. CFE의 ABTS free radical 소거능 측정 결과, CFE의 IC₅₀ 값은 66.78 ± 0.30 , 표준물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.39 ± 0.08 으로 측정되었다 (Fig. 1).

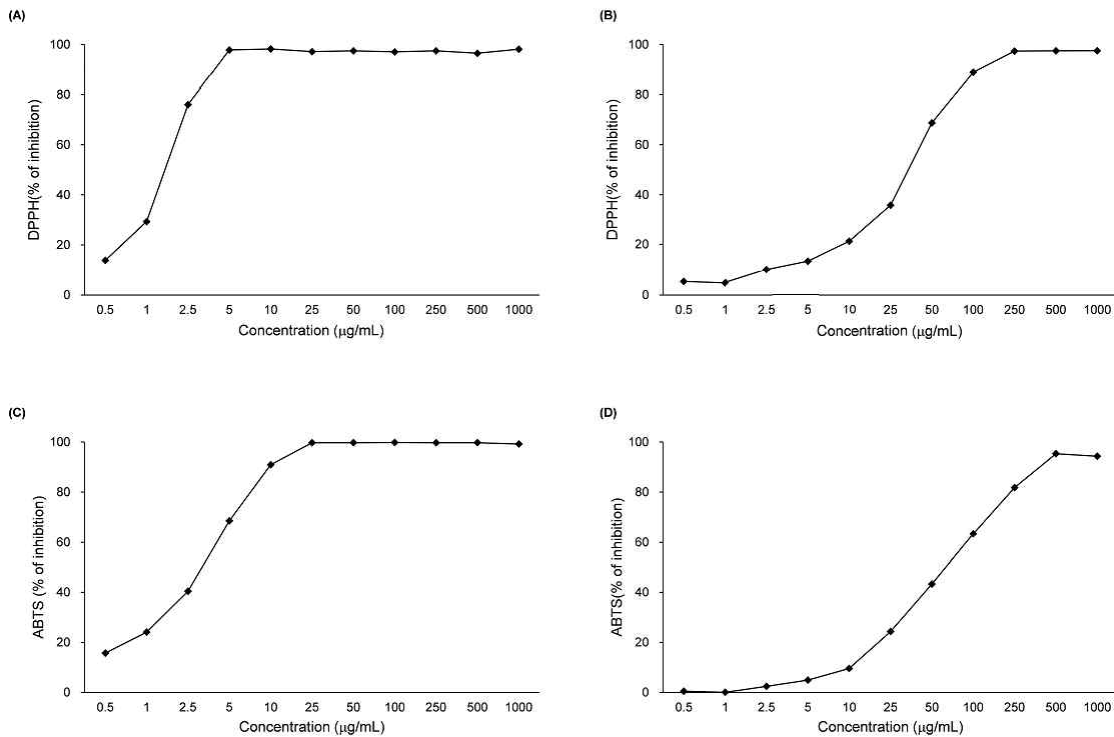


Fig. 1. Scavenging activity of CFE on DPPH and ABTS free radical. DPPH free radical scavenging activity of L-ascorbic acid; (A), DPPH free radical scavenging activity of CFE; (B), ABTS free radical scavenging activity of L-ascorbic acid; (C), ABTS free radical scavenging activity of CFE; (D).

2. 체중 및 식이섭취량

2주 약물투여 기간 동안 체중의 변화량은 N군 60.30 ± 2.01 , Con군 58.94 ± 2.29 , INDO군 61.86 ± 0.83 , CFE군 61.50 ± 1.76 으로 각 군간 유의성은 나타나지 않았다. 식이섭취량은 하루 평균 N군 40.94 ± 5.92 , Con군 38.88 ± 5.57 , INDO군 39.39 ± 6.30 , CFE군 40.39 ± 6.42 으로 각 군간 유의성은 나타나지 않았다 (Table. 1).

3. 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, 약물투여 2주 후 각 군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정한 결과, Con군 204.09 ± 12.43 , INDO군 142.05 ± 9.85 ($p < 0.001$), CFE군 147.32 ± 3.40 ($p < 0.001$)으로 INDO군, CFE군 모두 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

Table 1. Body Weight and Food Intake

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)
N	297.88 ± 4.26	358.18 ± 5.31	60.30 ± 2.01	40.94 ± 5.92
Con	286.67 ± 5.54	345.61 ± 7.60	58.94 ± 2.29	38.88 ± 5.57
INDO	289.50 ± 3.25	348.07 ± 2.56	61.86 ± 0.83	39.39 ± 6.30
CFE	282.17 ± 5.25	343.67 ± 5.21	61.50 ± 1.76	40.39 ± 6.42

N ; normal rats, Con ; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SD, n=10 rats per group.

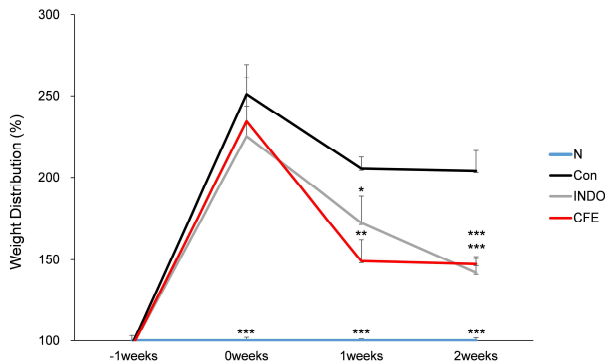


Fig. 2. The changes in relative hind paw weight distribution in MIA-induced osteoarthritis rats.

N ; normal rats, Con ; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 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 by student LSD test.

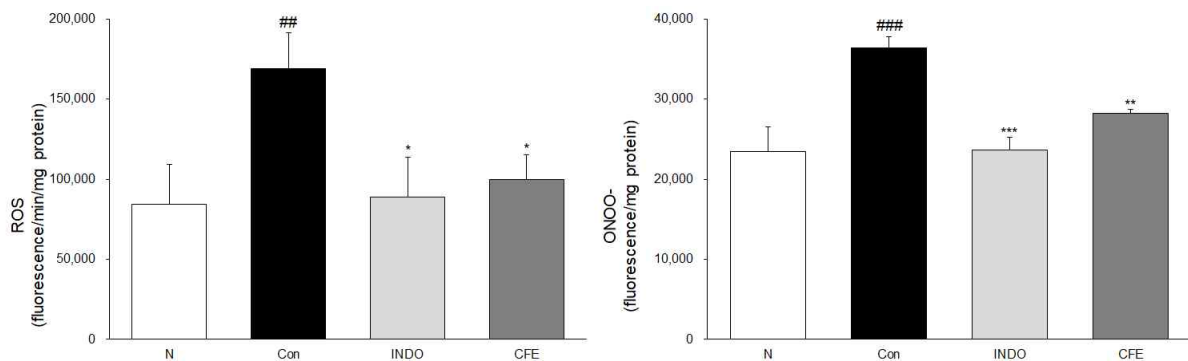


Fig. 3. Oxidative stress biomarker in articulation tissues.

Oxidative stress biomarker reactive oxygen species (ROS) and produces peroxynitrite (ONOO⁻) in articulation tissues. N ; normal rats, Con ; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means ± SD, n=10 rats per group. Significance: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared vs. normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student LSD test.

5. 관절조직 내 항산화 관련 인자 발현량 분석

관절 조직 내 항산화 관련 인자의 발현량을 western blot 으로 분석하였다. Nrf2 측정 결과, N군 1.00 ± 0.11 대비 Con군은 0.64 ± 0.02 ($p < 0.001$)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.83 ± 0.04 ($p < 0.05$), 0.93 ± 0.03 ($p < 0.01$)으로 Con군 대비 유의하게 증가하였다.

4. 산화적 스트레스 바이오마커 측정 결과

관절조직 내 산화적 스트레스 마커인 ROS, ONOO⁻를 측정하였다. ROS를 측정한 결과, N군 84,310 ± 24,957 대비 Con군은 168,978 ± 22,555 ($p < 0.01$)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 89,054 ± 24,521 ($p < 0.05$), 99,705 ± 15,335 ($p < 0.05$)으로 유의하게 감소하였다. ONOO⁻를 측정한 결과, N군 23,460 ± 3,035 대비 Con군은 36,425 ± 1,397 ($p < 0.001$)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군과 CFE군은 각각 23,654 ± 1,595 ($p < 0.001$), 28,196 ± 574 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3).

HO-1 측정 결과, N군 1.00 ± 0.06 대비 Con군은 0.82 ± 0.03 ($p < 0.05$)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.90 ± 0.08, 0.84 ± 0.03으로 Con군 대비 증가하는 경향이 나타났다. SOD 측정 결과, N군 1.00 ± 0.02 대비 Con군은 0.88 ± 0.01 ($p < 0.001$)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.95 ± 0.01 ($p < 0.01$), 1.02 ± 0.02 ($p < 0.001$)으로 Con군 대비 유의하게 증가하였다.

catalase 측정 결과, N군 1.00 ± 0.06 대비 Con군은 0.60 ± 0.04 ($p < 0.001$)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.79 ± 0.03 ($p < 0.01$), 0.91 ± 0.03 ($p < 0.001$)으로 Con군 대비 유의하게 증가하였다. GPx-1/2

측정 결과, N군 1.00 ± 0.10 대비 Con군은 0.78 ± 0.01 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.89 ± 0.01 , 0.91 ± 0.02 으로 Con군 대비 증가하는 경향이 나타났다 (Fig. 4).

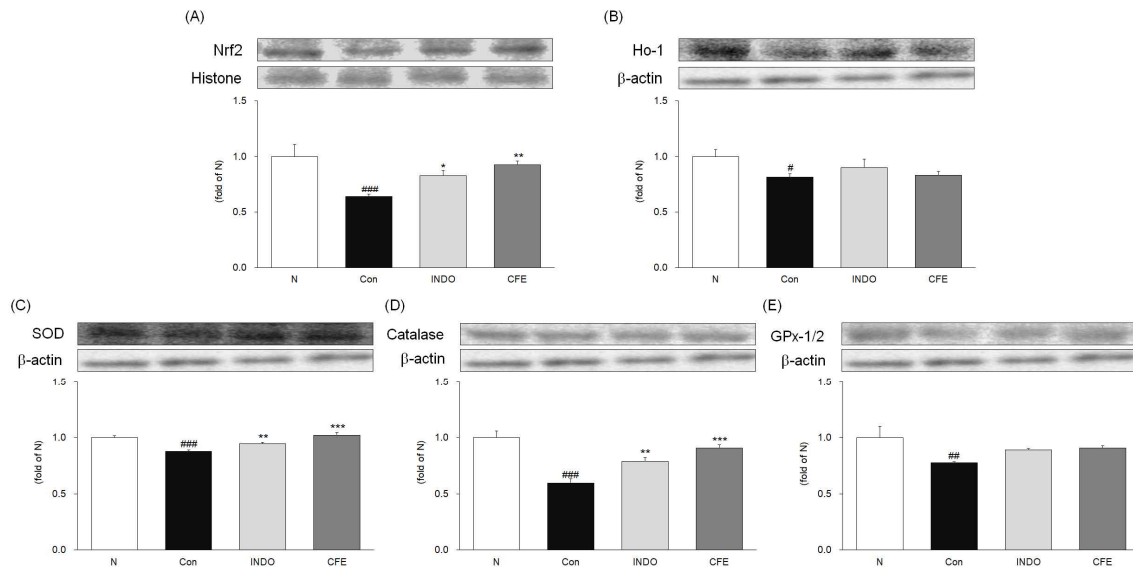


Fig. 4. Expression anti-oxidant enzyme in articular tissue.

anti-oxidant enzyme Nrf2; (A), HO-1; (B), SOD; (C), catalase; (D), GPx-1/2; (E). N ; normal rats, Con ; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=10 rats per group. Significance: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared vs. normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student LSD test.

6. 관절조직 내 염증성 단백질 발현량 분석

1) NF- κ Bp65p, p-I κ B α 염증성 단백질 발현량 분석

관절조직에서 염증성 매개인자인 NF- κ Bp65p, p-I κ B α 를 측정하였다. NF- κ Bp65p 측정 결과, N군 1.00 ± 0.10 대비 Con군은 1.43 ± 0.06 ($p < 0.001$)으로 유의하게 증가하였으며,

INDO군, CFE군은 각각 1.35 ± 0.04 , 1.03 ± 0.04 ($p < 0.001$)으로 Con군 대비 CFE군이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. p-I κ B α 측정 결과, N군 1.00 ± 0.04 대비 Con군은 1.26 ± 0.06 ($p < 0.01$)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.02 ± 0.05 ($p < 0.05$), 1.03 ± 0.10 ($p < 0.05$)으로 Con군 대비 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

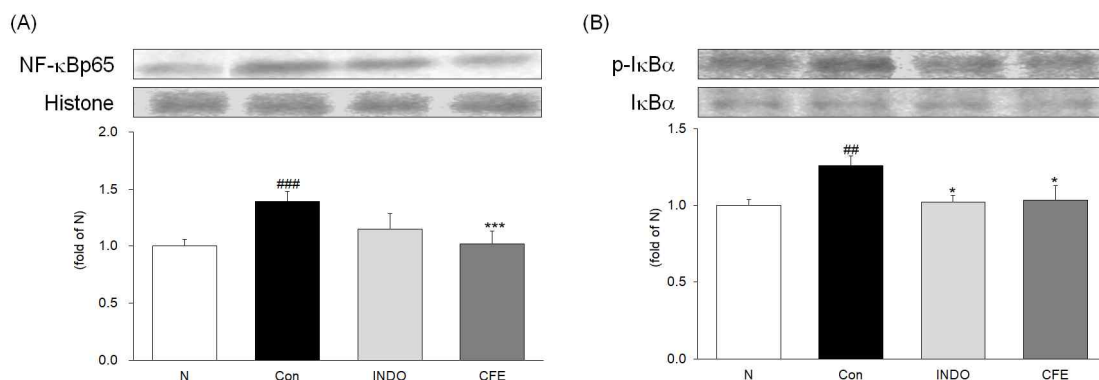


Fig. 5. Expression inflammation-related proteins in articular tissue.

Inflammation-related proteins NF- κ Bp65; (A), p-I κ B α ; (B). N ; normal rats, Con ; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE ; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=10 rats per group. Significance: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared vs. normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student LSD test.

2) COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β 염증성 단백질 발현량 분석

관절조직 내 염증성 매개인자인 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 단백질 발현량을 측정하였다. COX-2 측정 결과, N군 1.00 \pm 0.06 대비 Con군은 1.39 \pm 0.10 (p < 0.05)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.14 \pm 0.14, 1.02 \pm 0.11 (p <0.05)으로 Con군 대비 CFE군이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. iNOS 측정 결과, N군 1.00 \pm 0.08 대비 Con군은 1.35 \pm 0.03 (p <0.001)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.16 \pm 0.06 (p <0.05), 1.21 \pm 0.07으로 Con군 대비 CFE군이 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 나타냈다. TNF- α 측정

결과, N군 1.00 \pm 0.03 대비 Con군은 1.70 \pm 0.12 (p < 0.001)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.09 \pm 0.06 (p <0.001), 1.17 \pm 0.026 (p <0.001)으로 Con군 대비 유의하게 감소하였다. IL-6 측정 결과, N군 1.00 \pm 0.04 대비 Con군은 1.41 \pm 0.07 (p <0.001)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.01 \pm 0.05 (p < 0.001), 1.09 \pm 0.03 (p <0.001)으로 Con군 대비 유의하게 감소하였다. IL-1 β 측정 결과, N군 1.00 \pm 0.03 대비 Con군은 1.54 \pm 0.04 (p <0.001)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.24 \pm 0.04 (p <0.001), 1.25 \pm 0.03 (p <0.001)으로 Con군 대비 유의하게 감소하였다 (Fig. 6).

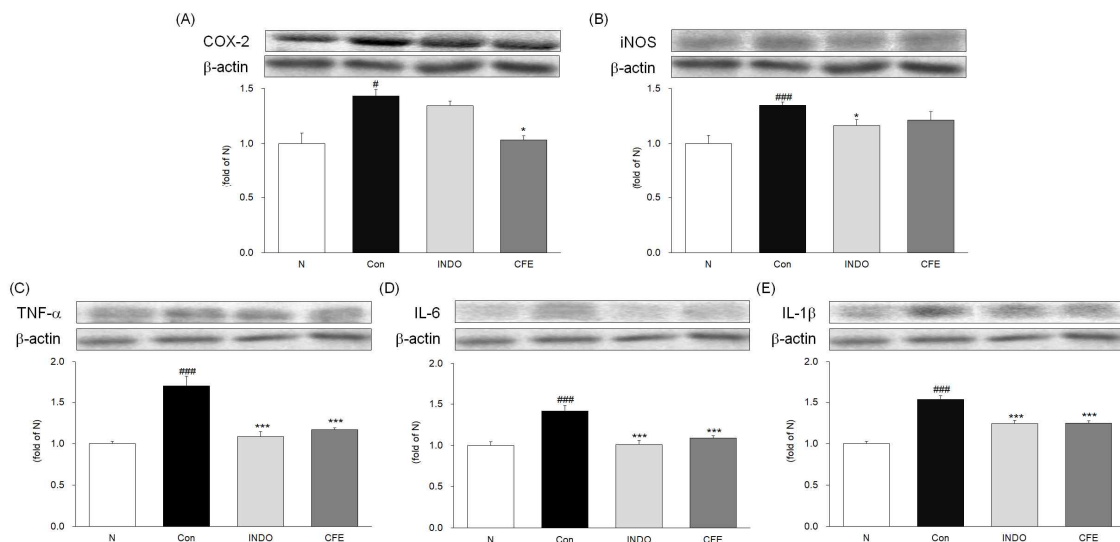


Fig. 6. Expression inflammation-related proteins in articular tissue.

Inflammation-related proteins COX-2; (A), iNOS; (B), TNF- α ; (C), IL-6; (D), IL-1 β ; (E). N; normal rats, Con; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 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 compared vs. normal group and * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student LSD test.

7. 관절조직 내 TIMP-1, MMP-1 발현량 분석

관절조직 내 TIMP-1의 발현량을 측정한 결과, N군 1.00 \pm 0.10 대비 Con군은 0.63 \pm 0.11 (p <0.05)으로 유의하게 감소하였으며, INDO군, CFE군은 각각 0.89 \pm 0.07, 0.81 \pm 0.14으로 Con군 대비 증가하는 경향을 나타내었다. MMP-1을 측정한 결과, N군 1.00 \pm 0.07 대비 Con군은 1.43 \pm 0.04 (p <0.001)으로 유의하게 증가하였으며, INDO군, CFE군은 각각 1.22 \pm 0.04 (p <0.05), 1.08 \pm 0.11 (p <0.01)으로 Con군과 대비하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 7).

IV. 고찰

층층나무과(Cornaceae)에 속하는 山茱萸(Corni Fructus)의 性味는 酸澁하면서 微溫하고 귀경은 肝腎經이며 澀精固脫, 補益肝腎하여 腰膝酸痛, 眩暈耳鳴, 遺尿, 陽痿遺精, 大汗虛

脫, 內熱消渴, 尿意頻數, 崩漏帶下 등의 증상에 사용하며, 현대에는 혈압강화와 다뇨증, 항암, 항균, 요통, 신경쇠약, 이명 등의 병증에 사용한다^{15,16}. 山茱萸의 주성분으로는 stearic acid, saponin, ursolic acid, tyrosine, linolenic acid, palmitic acid, morroniside, loganin, valine, oleic acid 등이 알려져 있으며, 당뇨와 알리지 및 염증 등을 치료하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁷.

골관절염(osteoarthritis)은 연골이 점차적으로 닳아 소실됨에 따라 연골하골 및 활액막의 2차적인 변화로 나타나는 병증으로 노년층에서 특히 높은 유병율을 보이는 추세이다¹⁸.

한의학에서 골관절염은 關節風, 痺症, 鶴膝風, 脚氣에 속해 있으며, 신체의 肌肉과 筋骨 등에 생기는 질병으로 麻木, 痛症 등과 같은 증상이 나타나며, 치료방법으로는 祛風濕, 化濕痰, 清血熱 작용을 통하여 氣血을 조화시키고 經脈을 소통시키기 위해 뜸, 침, 약물 등으로 치료한다^{19,20}.

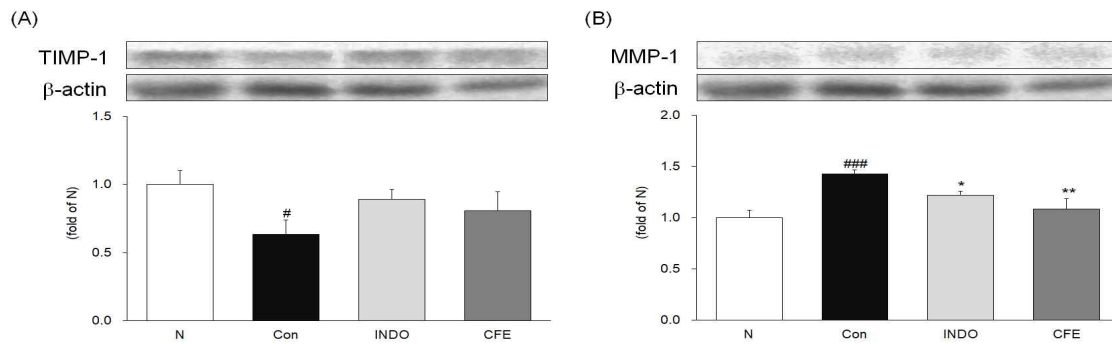


Fig. 7. The expression levels of TIMP-1 and MMP-1 in articular tissue.

TIMP-1; (A), MMP-1; (B). N; normal rats, Con; MIA-induced osteoarthritis rats, INDO; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, CFE; MIA-induced osteoarthritis rats treated with Corni Fructus 30% ethanol extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=10 rats per group. Significance: [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ compared vs. normal group and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student LSD test.

MIA(monosodium iodoacetate)로 골관절염이 유발된 동물모델은 연골의 손상 및 통증 등이 실제의 골관절염과 유사하여²¹⁾ 한방에서 골관절염을 위해 많은 연구들이 하고 있다. 이에 본 연구에서는 山茱萸 30% ethanol 추출물이 골관절염이 유발된 동물모델에서 뒷다리 체중 부하 측정, ROS, ONOO⁻ 측정, 관절조직 western blotting 분석으로 인하여 골관절염에 효과가 있는지에 대하여 알아보았다.

ROS가 정상적으로 소거되지 않고 체내에 축적되면 세포를 산화적 스트레스 상태로 만들고, ONOO⁻는 산화적 스트레스 상태에서 염증 등과 같은 여러 만성질환의 발생의 원인이 되기도 한다²²⁾. 이러한 ROS와 ONOO⁻를 측정한 결과, N군에 비하여 Con군에서 유의성 있게 증가하였으며, Con군에 비하여 CFE군에서 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

항산화 관련 인자들은 세포 내에서 증가된 산화적 스트레스의 조절 및 방어기전 역할을 한다고 알려진 바가 있다²³⁾. 이러한 항산화 전사 인자인 Nrf2와 항산화 효소 단백질로 알려진 HO-1, catalase, GPx-1/2을 관절조직의 western blotting으로 분석한 결과, N군에 비하여 Con군에서 유의성 있게 감소하였고, Con군에 비하여 CFE군에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

산화적 스트레스로 인한 염증을 확인하기 위해 관절조직에서 염증성 사이토카인과 매개인자를 분석한 결과, CFE군이 NF- κ Bp65의 발현을 감소시켰으며, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 p-I κ B α 의 발현을 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

관절조직 내의 단백질 분해 인자인 MMP-1, TIMP-1의 발현량을 분석하였다. 기질단백분해효소로 알려진 MMPs(Matrix metalloproteinases)는 생명 현상 유지를 위한 필수 조절 단백질지만, 나이가 들수록 정상보다 많이 발현되어 염증세포의 섬유화 및 침윤 등의 증상이 나타나게 된다²⁴⁾. TIMPs(Tissue inhibitors of metalloproteinases)는 MMPs와 서로 상호작용으로 인해 MMPs의 분비를 억제하여 활성도 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. TIMP-1 발현량 측정 결과, N군에 비하여 Con군에서 유의성 있게 감소하였고, Con군에 비하여 CFE군에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

MMP-1 발현량 측정 결과, N군에 비하여 Con군에서 유의성 있게 증가하였고, Con군에 비하여 CFE군에서 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이 결과를 통해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 MIA로 유발된 골관절염 동물모델에 개선효과가 있음을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

본 연구에서는 MIA 골관절염 유발 동물모델에서 山茱萸 30% ethanol 추출물을 경구 투여하여 골관절염 개선 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뒷다리 체중 부하 측정 결과, Con군에 비해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 유의성 있게 감소시키는 것을 확인하였다.
2. 관절조직 내에서 산화적 스트레스 관련 인자인 ROS와 ONOO⁻를 측정한 결과, Con군에 비해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
3. 관절조직 내에서 Nrf2와 항산화 효소인 HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현량을 측정한 결과, 山茱萸 30% ethanol 추출물이 유의하게 증가시켰다.
4. 관절조직 내에서 NF- κ Bp65와 p-I κ B α 를 측정한 결과, 山茱萸 30% ethanol 추출물이 I κ B α 의 인산화를 감소 시킴으로서 NF- κ Bp65의 발현을 감소시킴을 확인하였다.
5. 관절 조직 내 단백질 분해 인자의 발현량을 확인하기 위하여 TIMP-1, MMP-1의 발현을 측정한 결과, TIMP-1의 발현량은 Con군에 비해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며,

MMP-1의 발현량은 Con군에 비해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 유의하게 감소시켰다.

따라서 MIA 골관절염 유발 동물모델에서 뒷다리 부하 무게, 항산화 관련 인자, 염증 관련 매개인자 및 사이토카인의 발현과 관절조직 내 단백질 분해 인자의 발현량 측정 결과를 통해 山茱萸 30% ethanol 추출물이 골관절염 개선 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호 : PJ01425 1022019)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- 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 Korean Diet Assoc.* 2014;20(2):99-109.
- 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.
- Yang DH, Woo CH, An HD. Effects of Jinmu-tang on the Osteoarthritis by MIA in Rats. *J Korean Medicine Rehabilitation.* 2018;28(1):19-31.
- Kim JS, Lee AY, Moon BC, Kim HS, Kim WJ, Kim C, Choi GY, Kim SH, Chun JM. Effects of aqueous extract from *Taxillus chinensis* on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Kor J herb.* 2018;33(5):81-8.
- 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 herb.* 2014;29(4):45-52.
- Sim WH, Seo BI. A study on the effect comparative of *acanthopanax stem bark (ASB)* and *acanthopanax root bark (ARB)* on the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. *Kor J herb.* 2018;33(5):53-66.
- 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.
- Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. *J Korean Pharmacogn* 1993;24:177-82.
- Sohn KH, Kim JS. Anti-dementia Effects of *Cornus officinalis S. et Z. extract* on the Scopolamine Induced Dementia in Mouse. *J Korean Pharmacogn.* 2017;48(4):304-13.
- Kim YJ, Son DY. Antioxidant activity and suppression of pro-inflammatory mediator of *Corni fructus* extracts in activated RAW 264.7 macrophage. *J Korean Food Preserv.* 2016;23(6):876-82.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26:1199-200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 1992;13(3):637-48.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydro-hodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(2):149-56.
- Professors of herbology in college of oriental medicine. *Herbology.* Seoul: Younglimsa. 2004; 687-8.
- Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of *corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chemists' Soc.* 2005;22:157-67.
- Han YK, Park YK. The comparisons of *Lycii Radicis Cortex* and *Corni Fructus water extract* effects on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Kor J herb.* 2013;28(6):71-77.
- Kim HJ, Shin EC, Yoo NJ, Park JH, Kim SK, Kang ES, Jahng JS. Apoptosis of Chondro cytes and Its Regulation in Pathogenesis of Osteoarthritis. *J Korean Rheumatic Diseases.* 2001;8(2):104-17.
- 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.
- Korean Acupuncture & Moxibustion Society. *The Acupuncutre and Moxibustion Medicine.* Seoul : Jibmoondang. 2012:507-9, 518-22.
- Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. *Neurosci Lett.* 2004;370(2-3):236-40.
- 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.
23. Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, Gjorgoski I, Jankulovski N. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidation in senescent rat erythrocytes. *Physiol Res*. 2015; 64(6):891-6.
 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.