



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2017년 2월

박사학위 논문

목통 추출물이 **monosodium
iodoacetate**로 유발한 흰쥐의
골관절염에 미치는 효과

조선대학교 대학원

보완대체의학과

백 종 욱

목통 추출물이 monosodium
iodoacetate로 유발한 흰쥐의
골관절염에 미치는 효과

Effects of *Akebia Quinata* extracts on Monosodium
Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats

2017년 2월 24일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

백 종 욱

목통 추출물이 monosodium
iodoacetate로 유발한 흰쥐의
골관절염에 미치는 효과

지도교수 소 금 영

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로

제출함

2016년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

백 종 욱

백종욱의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	이미자	(인)
위원	조선대학교	교수	문경래	(인)
위원	조선대학교	부교수	김상훈	(인)
위원	대전대학교	연구원	심부용	(인)
위원	조선대학교	교수	소금영	(인)

2016년 12월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	1
I. 서론	3
II. 연구방법	5
A. 연구 재료	5
1. 시약	5
2. 기기	5
3. 세포	6
4. 동물 및 사료	6
B. 연구 방법	7
1. 시료 및 추출	7
2. 세포 배양	7
3. 세포 독성 평가	7
4. 항산화 효능 평가	7
a. 총 폴리페놀 함량	7
b. 총 플라보노이드 함량	8
c. DPPH 라디칼 소거능	8
d. ABTS 라디칼 소거능	8
e. 활성산소 (reactive oxygen species; ROS) 생성량	9
5. 항염증 효능 평가	9
a. 산소질소 (Nitric oxide; NO) 생성량	9
b. 염증 사이토카인 (Cytokine) 생성량	9
6. 골관절염 동물에서의 효능 평가	9
a. 동물 실험 그룹 분류 및 시료 투여	9

b. 골관절염 유발	10
c. COX-2 생성량	10
d. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 생성량	10
e. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 생성량	11
f. TIMP-1 생성량	11
g. C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 생성량	11
h. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 생성량	12
i. Leukotriene B4 (LTB ₄) 생성량	12
j. CRP 검사	12
k. 칼시토닌(Calcitonin) 생성량	12
l. 아그레칸(Aggrecan) 생성량	13
m. 글리코사미노글리칸(Glycosaminoglycan) 생성량	13
n. 컴퓨터단층촬영	13
o. 조직검사	13
7. 통계 처리	13
III. 연구결과	15
A. 세포 독성	15
B. 항산화 효과	16
1. 총 폴리페놀 함량	16
2. 총 플라보노이드 함량	17
3. DPPH 라디칼 소거능	18
4. ABTS 라디칼 소거능	19
5. 활성산소 (ROS) 생성량	20
C. 항염증 효과	21
1. 산소질소 (NO) 생성량	21
2. 염증 사이토카인 (Cytokine) 생성량	22
a. Interleukin-6 (IL-6) 생성량	22

b. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 생성량	23
D. 골관절염 동물에서의 효과	24
1. COX-2 생성량	24
2. MMP-2 생성량	25
3. MMP-9 생성량	26
4. TIMP-1 생성량	27
5. CTX II 생성량	28
6. COMP 생성량	29
7. LTB ₄ 생성량	30
8. CRP 수치	31
9. 칼시토닌 생성량	32
10. 아그레칸 생성량	33
11. 글리코사미노글리칸 생성량	34
12. 컴퓨터단층촬영	35
13. 조직검사	36
IV. 고찰	37
V. 결론	45
참고문헌	47

표 목차

Table 1. The components of diet	6
Table 2. Total polyphenols content of <i>Akebia Quinata</i> extract	16
Table 3. Total flavonoid content of <i>Akebia Quinata</i> extract	17

그림 목차

Figure 1. Cell viability of <i>Akebia Quinata</i> extract in RAW 264.7 cells	15
Figure 2. DPPH radical scavenging activity of <i>Akebia Quinata</i> extract	18
Figure 3. ABTS radical scavenging activity of <i>Akebia Quinata</i> extract	19
Figure 4. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on ROS production in RAW 264.7 cells	20
Figure 5. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on NO production in RAW 264.7 cells	21
Figure 6. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on IL-6 production in RAW 264.7 cells	22
Figure 7. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on TNF- α production in RAW 264.7 cells	23
Figure 8. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of cyclooxygenase-2 in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	24
Figure 9. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of matrix metalloproteinase-2 in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	25
Figure 10. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of matrix metalloproteinase-9 in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	26
Figure 11. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of TIMP-1 in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	27
Figure 12. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	28
Figure 13. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of Cartilage oligomeric matrix protein in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	29
Figure 14. Effects of <i>Akebia Quinata</i> extract on levels of Leukotriene B4 in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	30

Figure 15. Effects of *Akebia Quinata* extract on levels of CRP in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 31
Figure 16. Effects of *Akebia Quinata* extract on levels of calcitonin in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 32
Figure 17. Effects of *Akebia Quinata* extract on levels of aggrecan in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 33
Figure 18. Effects of *Akebia Quinata* extract on levels of glycosaminoglycan in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 34
Figure 19. Effects of *Akebia Quinata* extract on imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 35
Figure 20. Effects of *Akebia Quinata* extract on joint pathology(Safranin-O staining) from joint of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats 36

ABSTRACT

Effects of *Akebia Quinata* on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats

Baek, Chong Wouk

Advisor : Prof. So keum-young, Ph. D.

Dept. of Complementary & Alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

Objectives : The aim of this study is to investigate anti-arthritis activity using *Akebia Quinata* (AQ).

Methods : AQ was extracted with distilled water and was evaluated for its total polyphenol and flavonoid contents, scavenging activities through DPPH and ABTS analysis, as well as inhibition activities of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide and cytokines production in the LPS-induced RAW 264.7 cells. ROS production in cells were measured using flow cytometry. NO production was measured by ELISA and Cytokines including IL-1 β and IL-6 were measured by Luminex. AQ was administered at 200 mg/kg, and 400 mg/kg to SD-Rat, where arthritis was induced by monosodium iodoacetate (MIA) at 60 mg/ml. COX-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, CTX, COMP, LTB₄, CRP, calcitonin, aggrecan and glycosaminoglycan level in serum were measured by ELISA. The cartilage of patella volume was examined and 3-D high-resolution reconstructions of the cartilage of patella were obtained using a Micro-CT system. Also, The histopathological change of knee was observed by masson-trichrome (M&T) staining.

Results : AQ showed cell viability of 95% or higher in all concentrations in RAW 264.7 cells, indicating no cytotoxicity. DPPH and ABTS radical scavenging activity of AQ was increased in a dose-dependent manner. AQ treatment significantly suppressed LPS-induced osteoarthritis mediators, ROS, NO and cytokine production in RAW 264.7 cells. Production

of COX-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, CTXII, COMP and LTB4 level in serum was decreased, respectively, in comparison with control. The other way, production of calcitonin and glycosaminoglycan level in serum was increased, respectively, in comparison with control. But CRP and aggrecan level in serum wasn't difference appear. The cartilage of patella volume increased significantly. In addition, the NEM group showed a increase in the cartilage volume and proteoglycan.

Conclusions : In this results, AQ could be effectively used as a therapeutic drug based on its antioxidant, antiinflammatory and osteoarthritis factors. These results of AQ showed significant anti-arthritis activity. These results may be developed as a raw material for new health food to ease the symptoms mentioned above.

I. 서론

골관절염(osteoarthritis, OA)은 퇴행성관절염이라고 하는 가장 흔한 노인성 질환으로 주로 무릎, 고관절, 손가락, 하부 척추부위와 같이 장기간 지속적인 스트레스를 받은 관절에 많이 발생한다. 이러한 골관절염은 연골층 두께의 감소, 연골하골의 경화 및 낭종 형성, 관절 주변 및 관절 내 골의 과잉형성, 관절의 변형 등의 특징을 통해 동통, 관절의 강직감, 점진적인 관절의 운동 제한, 피로감, 종창 등을 초래한다[1,2].

국민건강보험공단 자료에 의하면 골관절염 진료인원은 2011년 약 336만명에서 2015년에는 376만명으로 5년간 약 40만명(11.2%)이 증가하였으며, 연평균 증가율은 2.24%로 나타났다. 또한 총 진료비는 2011년 9,468억원에서 2015년 11,632억원으로 5년간 약 2164억원(12.3%)이 증가하였으며, 연평균 증가율은 2.46%로 나타나 고령화에 따른 발병율이 점차 높아지고 있는 질환이다[3].

골관절염은 유전, 연령, 관절 외상, 비만 등의 이유로 인해 유발되는 것으로 알려져 있으나[4], 아직 정확한 원인이 밝혀지지 않은 질환으로 발생 초기에는 연골세포에 가해지는 물리적 장력에 대한 보상으로 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan)

의 생산이 증가되지만 기계적 스트레스가 지속되면 연골세포에 역학적 및 생화학적 변화로 프로테오글리칸 합성저하와 교원질대사에 변화가 초래되어 기질의 감소와 기질 구성요소의 합성억제, 섬유화, 연골의 침식, 연골세포의 증식, 골극형성, 연골하골의 경화를 야기하는 것으로 알려져 있다[5-7].

현재 골관절염의 치료는 증상 개선에 초점을 맞추어 소염진통제, 연골보호제 등의 약물 치료와 비약물 치료를 복합하여 사용하고 있는 실정이나[8], 소염진통제의 경우는 장기간 복용시 위장관의 부작용을 일으킬 우려가 있고 인공관절 치환술 또한 여러 합병증 등의 문제점이 발생 할 수 있다[9,10]. 이처럼 골관절염의 치료법은 장기복용의 부담과 각종 부작용의 문제점이 나타나면서 안전하고 효능이 입증된 천연물을 중심으로 골관절염에 대한 건강기능식품의 기호도 및 수요가 급격히 증가하고 있는 추세이다 그러나 관절 및 뼈 건강 관련 건강 기능성 식품의 대부분은 일부 의학계에서 그 효능에 대한 의문점을 제기한 바 있고, 이에 향후 지속적인 관절염 건강기능식품의 시장을 유지하고 형성함에 있어서 골관절염과 관련된 기능성 소재의 개발을 위해 이를 대체할 방안이 필요하며, 이러한 시점에서 새로운 골관절염에 대한 건강기능 식품의 원료개발에 대한 필요성이 증대되고 있다[11,12].

목통(木通, *Akebia Quinata*)은 木通科(으름덩굴과)에 속한 낙엽 혹은 으름덩굴 및 여덟잎 으름을 말하며, 개화기는 4~5월이며, 성숙기는 9~10월이다. 으름덩굴은 다른 나무를 감고 올라가면서 성장한다[13]. 겉껍질을 벗긴 줄기와 뿌리를 목통(木通), 열매는 예지자(豫知子)라 하여 약용한다. 우리나라 전역에 분포하고 남부지방 특히, 제주도에 흔하게 자생하고 계곡가의 너무 울창하지 않은 곳이나, 바위너덜 지대, 산기슭 등에 많이 있다. 줄기인 목통을 쓸 때는 손가락 굵기 이상이 좋고, 가는 줄기는 잎을 이용하면 좋다고 알려져 있다[14]. 효능은 동의보감[15]에 신우신염, 방광염, 요도염, 발진, 가슴앓이, 관절부위의 통증에 사용된다고 기재되어 있으나 아직까지 항관절염에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 동의보감에 기재된 관절통에 대한 효능에 착안하여 목통의 독성검사, 항염증 및 항산화 측정과 더불어 monosodium iodoacetate(MIA)로 골관절염을 유발한 흰쥐을 활용하여 혈청내 골관절염 유관인자, 컴퓨터단층촬영 및 조직 검사 등을 통해 목통 추출물이 골관절염에 미치는 효과를 확인하고자 하였으며 더 나아가 골관절염에 대한 건강기능식품의 원료 소재로써의 가능성을 제시하고자 하였다.

monosodium iodoacetate

II. 연구방법

A. 연구 재료

1. 시약

시약은 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 소우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), Cell Titer 96® AQueous One Solution (MTS : Promega Co., U.S.A.), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), Mouse IL-1 β Quantikine ELISA Kit (R&D system, U.S.A.), Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D system, U.S.A.), Mouse TNF- α Quantikine ELISA Kit (R&D system, U.S.A.), 1,1 - diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), Rat total MMP-3 quantikine ELISA kit, (R&D system, U.S.A.) Rat total MMP-9 quantikine kit (R&D system, U.S.A.), Rat TIMP-1 quantikine kit (R&D system, U.S.A.), LTB₄ parameter ELISA kit (R&D system, U.S.A.), Rat aggrecan ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), Rat cartilage oligomeric matrix protein (COMP) ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), Rat calcitonin ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), Rat Cross-Linked C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX-II) ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), Rat Glycosaminoglycans ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), Rat COX-2 ELISA kit (Mybiosource CO., U.S.A.), MIA : Monosodium iodoacetate (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 기기

기기는 열탕추출기(DWT-1800T, 대응, Korea), 감압증류장치(rotary vacuum evaporator : EYELA FDU-540, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co.,

U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), 원심분리기(Hanil Co., Korea), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.), 동결 건조기(IIShinBioBase, Korea), Incapacitance Test Meter (IITC Life Science, california, U.S.A.) 등을 사용하였다.

3. 세포주

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주 은행 (Korea)에서 구입하였다.

4. 동물 및 사료

수컷 6주령의 SD-Rat (170-200g)을 (주)새론바이오(Korea)사에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료 (주)퓨리나, Table 1)와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 동물실험윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인(승인번호 - DJUARB 2016-018)을 받았다.

Table 1. The Components of Diet

Components	Percentage (%)
Crude protein	20.00
Crude fat	4.50
Crude fiber	6.00
Crude calcium oxide	7.00
Calcium	0.50
Phosphorus	1.00

B. 연구 방법

1. 시료 및 추출

목통(*Akebia quinata*, 이하 AQ)은 약초명가(Korea)에서 구매한 후 50 g의 목통과 증류수 1L를 유리 둥근 플라스크에 넣고 2시간 30분 동안 환류추출을 진행하였다. 이후 paper filter를 통해 걸러진 여과액을 감압 농축한 다음 동결 건조하여 분말 4.7 g (수득율 9.4%)을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고에 보관하며 필요한 농도로 3차 증류수에 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양

RAW 264.7 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 CO₂ 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3. 세포 독성 평가

AQ 추출물에 대한 세포 독성 평가는 96 well plate에 1.0×10⁵ cells/well로 RAW264.7 세포를 분주하고 18시간 동안 배양한 후 AQ 추출물을 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 2 mg/ml 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 20 μl의 MTS solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 4시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

4. 항산화 효능 평가

a. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 methanol로 용해하여 1 mg/ml 농도로 준비한 시료 100 μl에 Folin-Denis reagent를 100 μl을 가하여 혼합한 후 3분간 실온에 반응시켰다. 3분 후 10% sodium carbonate solution 100 μl을 가하여 혼합하고 1시간 반응시킨 후 상층액을 취하여 Microplate reader를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 methanol에 녹인 10 μg/ml, 30 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 150 μg/ml, 200 μg/ml, 250 μg/ml, 300 μg/ml의 gallic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

b. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 methanol로 용해하여 1 mg/ml 농도로 준비한 시료 100 μ l에 diethylene glycol을 1 ml씩 가하여 혼합하였다. 혼합 후 1 N NaOH를 100 μ l 가하여 잘 혼합하고 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 Microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 methanol에 녹인 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml, 250 μ g/ml, 300 μ g/ml의 quercetin의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

c. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 시료를 1 mg/ml 농도로 준비하였다. DPPH 시약은 빛을 차단한 상태에서 0.1 mM 농도가 되도록 methanol에 녹여 준비하였다. 시료 100 μ l과 DPPH 시약 500 μ l을 넣고 20분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후 Microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 용액의 대조군으로 시료 대신 methanol을 사용하여 보정값을 얻은 후 다음과 같은 식을 이용하여 DPPH 소거율을 산출하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

d. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능 측정을 위해 시료를 20 mg/ml 농도로 준비하였다. 7.4 mM ABTS (2,2 - azino - bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS⁺)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS⁺ 용액 150 μ l와 ESE를 각각 5 μ l 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 용액의 대조군으로 시료 대신 1차 증류수를 사용하여 보정 값을 얻은 후 다음과 같은 식을 이용하여 ABTS 소거율을 산출하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

e. 활성산소 (reactive oxygen species; 이하 ROS) 생성량

ROS 생성량은 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, AQ 추출물을 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA은 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

5. 항염증 효능 평가

a. 산화질소 (Nitric oxide; 이하 NO) 생성량

NO 생성량은 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, AQ 추출물을 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 배양 후, N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

b. 염증 사이토카인 (Cytokine) 생성량

염증 사이토카인 생성량은 RAW 264.7 세포를 12 well plate에 세포를 2×10^5 cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, AQ 추출물을 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 배양 후 원심분리한 상청액으로 IL-6, TNF- α 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

6. 골관절염 동물에서의 효능 평가

a. 동물 실험 그룹 분류 및 시료 투여

동물 실험그룹은 관절염을 유발하지 않은 정상그룹과 관절염을 유발하고 증류수를

투여한 대조그룹, AQ 추출물을 200, 400 (mg/kg)으로 각각 투여한 실험그룹 등 총 4그룹으로 나누어 그룹 당 8마리씩 분류하였다.

시료 투여는 골관절염의 억제기능과 치료에 대한 효능을 알아보고자, 골관절염 유발 2주전부터 AQ 추출물을 각각 매일 1회, 식약처 가이드라인에 나온 수용액의 경구 투여 최대 용량인 2 ml씩 오후 3시에 경구 투여 하였고 골관절염 유발 후에도 4주 동안 계속 진행하였다.

b. 골관절염 유발

경구 투여 2주차가 종료된 후 마취제 (졸레틸 0.4 ml + 럼폰 0.1 ml)로 Rat를 마취하여 오른쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA를 당뇨주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 60 mg/ml의 농도로 50 μ l씩 투여하였고 MIA 희석시에는 0.9% Saline을 사용하였다.

c. COX-2 생성량

COX-2 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 100 μ l의 스펠다드와 혈청 샘플을 넣고 1시간 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 반응시키고 wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 antibody를 넣고 다시 1시간 동안 CO₂ 배양기에 넣어 반응시켰다. 이후, washing 작업을 실행한 후 100 μ l Conjugate를 넣고 30분 동안 CO₂ 배양기에서 반응 시킨 뒤 washing 작업 후 50 μ l의 Color reagent A용액과 B용액을 넣은 후 30분 동안 CO₂ 배양기에서 빛을 차단한 채 반응시키고 Color reagent C 용액을 추가한 뒤 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

d. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 생성량

MMP-2 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 100배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-116 시약을 각 50 μ l씩 넣은 후 스펠다드와 혈청 샘플을 추가로 50 μ l를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 200 μ l의 Total MMP-2 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 200 μ l의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 빛을 차단한 채 반응시키고 50 μ l의 Stop Solution을 넣어 Microplate reader를

이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

e. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 생성량

MMP-9 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 10배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-34 시약을 각 50 μ l씩 넣은 후 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 추가로 50 μ l를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 Total MMP-2 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 100 μ l의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μ l의 Stop Solution을 넣어 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

f. TIMP-1 생성량

TIMP-1 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 20배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 RD1-21 시약을 각 50 μ l씩 넣은 후 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 추가로 50 μ l를 넣고 2시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 TIMP-1 Conjugate를 넣고 다시 2시간 동안 plate shaker에서 혼합하였다. 다시 washing 작업 후 100 μ l의 Substrate Solution 용액을 첨가한 후 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μ l의 Stop Solution을 넣어 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

g. C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 생성량

C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen (CTX II) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 넣고 100 μ l의 HRP-conjugate reagent를 추가한 후 다시 1시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μ l의 Chromogen Solution A와 B를 순차적으로 넣고 15분 동안 CO₂ 배양기에서 반응시키고 50 μ l의 Stop Solution을 넣고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

h. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 생성량

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 3배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 100 μ l의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 1시간 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 Rat COMP antibody를 넣고 1시간 동안 CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 다시 washing 작업을 실행한 후 100 μ l의 enzyme-conjugate를 넣고 30분 동안 CO₂ 배양기에서 반응시키고 washing 작업을 실행하고 Color Reagent를 100 μ l 넣어 30분 동안 반응시켰다. 추가로 100 μ l의 Color reagent C 용액을 넣고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

i. Leukotriene B₄ (LTB₄) 생성량

LTB₄ 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 50 μ l의 Primary Antibody Solution을 추가한 후 1시간 동안 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. 이후, 500 μ l의 LTB₄ Conjugate를 넣고 다시 3시간 동안 plate shaker에서 혼합하고 wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 200 μ l의 Substrate Solution 용액을 첨가하여 30분 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 빛을 차단한 채 반응시키고 100 μ l의 Stop Solution을 넣고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

j. CRP 검사

CRP 검사는 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 서울의과학연구소에 의뢰하여 측정하였다.

k. Calcitonin 생성량

Calcitonin 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 50 μ l의 스탠다드와 컨트롤, 혈청 샘플을 넣고 100 μ l의 HRP-conjugate reagent를 추가한 후 1시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μ l씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μ l의 Chromogen Solution A와 B를 순차적으로 넣고 15분 동안 CO₂ 배양기에서 반응시키고 50 μ l의 Stop Solution을 넣고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

l. Aggrecan 생성량

Aggrecan 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청을 2배 희석시킨 후 측정하였다. 96 well plate에 50 μl 의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 100 μl 의 Conjugate를 추가한 후 1시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μl 씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μl 의 Substrate A 용액과 B 용액을 순차적으로 넣은 후 15분 동안 CO₂ 배양기에서 빛을 차단한 채 반응시키고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

m. Glycosaminoglycan 생성량

Glycosaminoglycan 생성량은 심장 채혈 후 얻은 혈액에서 분리된 혈청으로 측정하였다. 96 well plate에 100 μl 의 스탠다드와 혈청 샘플을 넣고 50 μl 의 Conjugate를 추가한 후 1시간 동안 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에 넣어 반응시켰다. 이후, wash buffer 200 μl 씩 넣고 washing 작업을 실행한 후 50 μl 의 Substrate A 용액과 B 용액을 순차적으로 넣은 후 15분 동안 CO₂ 배양기에서 빛을 차단한 채 반응시키고 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

n. 컴퓨터단층촬영

컴퓨터단층촬영은 혈액 채혈 후 경추 탈구 시킨 동물의 우측 대퇴부위와 경골 부위를 절단한 뒤 근육조직을 제거한 후 10% 포르말린 용액에 고정하여 micro-CT 촬영을 일산 소재의 동국대학교측에 의뢰하여 3D 변환 작업을 실시하였다.

o. 조직검사

조직검사는 혈액 채혈 후 경추 탈구 시킨 동물의 우측 대퇴부위와 경골 부위를 절단한 뒤 근육조직을 제거한 후 10% 포르말린에 고정시켜 HSKO (Korea) 업체에 의뢰하여 Safranin-O 염색을 진행하였다. 염색되어 온 조직슬라이드를 광학현미경을 통해 연골과 proteoglycan 등을 확인하였다.

7. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값 \pm 표준 편차 (mean \pm S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을

이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

III. 연구결과

A. 세포 독성

목통 추출물을 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다(Figure 1).

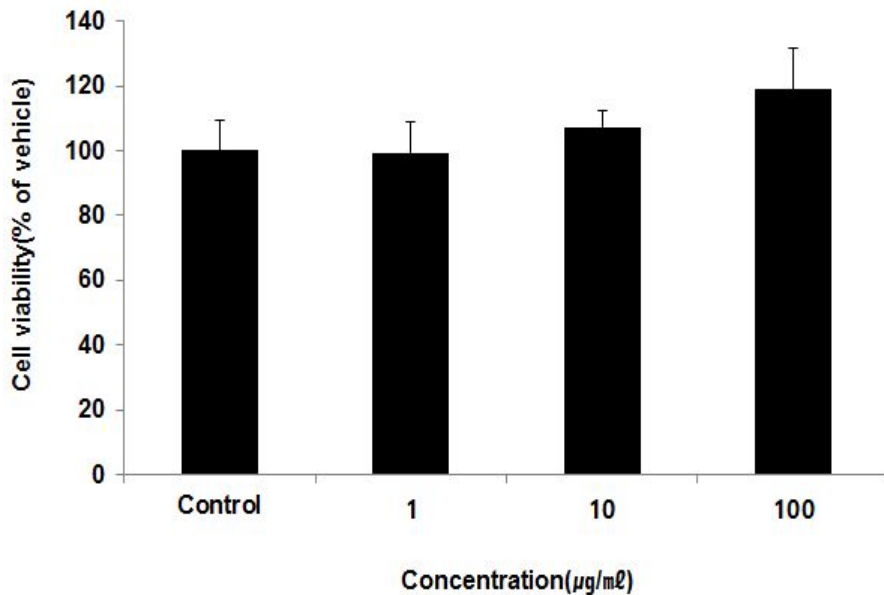


Figure 1. Cell viability of *Akebia Quinata* extract in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of sample for 24 hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

B. 항산화 효과

1. 총 폴리페놀 함량

목통 추출물의 총 폴리페놀 함량(mg/g)을 분석한 결과, 10 mg/ml 농도에서 280.7±1.7 mg/g의 총 폴리페놀 함량이 나타났다(Table 2).

Table 2. Total polyphenols Content of *Akebia Quinata* extract

Sample	Total polyphenol contents (mg/g)
10 mg/ml concentration of <i>Akebia Quinata</i> extract	280.7±1.7

The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

2. 총 플라보노이드 함량

목통 추출물의 총 플라보노이드 함량(mg/g)을 분석한 결과, 10 mg/ml 농도에서 101.3±0.5 mg/g의 총 플라보노이드 함량이 나타났다(Table 3).

Table 3. Total flavonoid content of *Akebia Quinata* extract

Sample	Total flavonoid contents (mg/g)
10 mg/ml concentration of <i>Akebia Quinata</i> extract	101.3±0.5

The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

3. DPPH 라디칼 소거능

목통 추출물을 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 DPPH 소거능을 분석한 결과, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 13.5 \pm 4.0%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 18.9 \pm 4.1%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 31.7 \pm 4.6%, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 76.3 \pm 6.0%로 나타나 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였다(Figure 2).

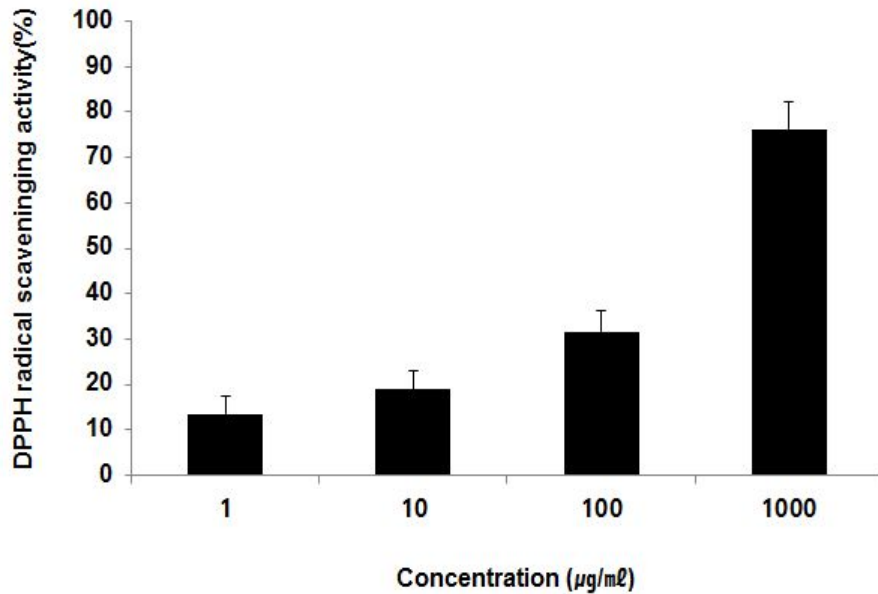


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *Akebia Quinata* extract. Extract was incubated with DPPH solution at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

4. ABTS 라디칼 소거능

목통 추출물을 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 ABTS 소거능을 분석한 결과, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $0.4\pm 1.1\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $2.2\pm 1.2\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $19.0\pm 2.3\%$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $86.8\pm 0.9\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였다(Figure 3).

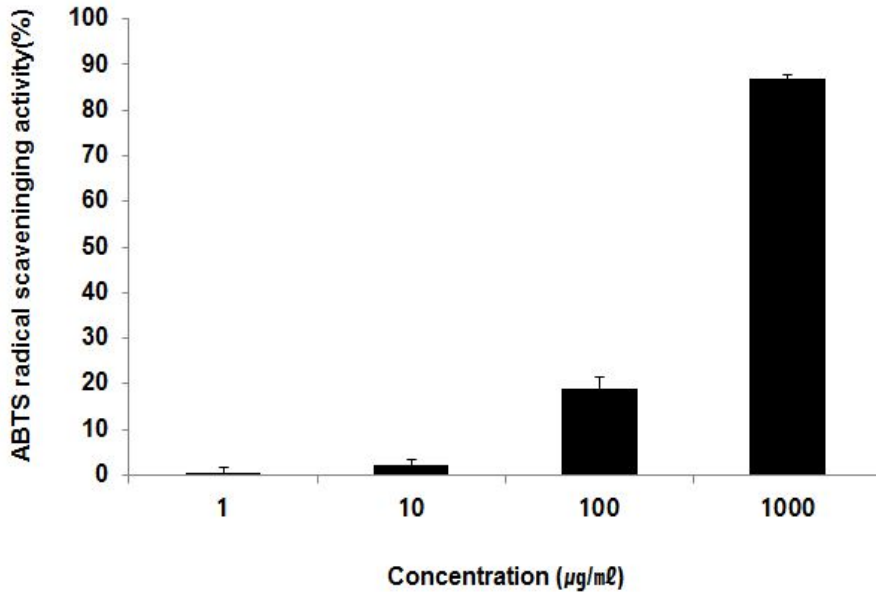


Figure 3. ABTS radical scavenging activity of *Akebia Quinata* extract. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

5. 활성산소 (ROS) 생성량

목통 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 활성산소 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때 목통 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 111.9 \pm 3.5%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 87.8 \pm 2.7%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 85.5 \pm 3.5%로 나타나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Figure 4).

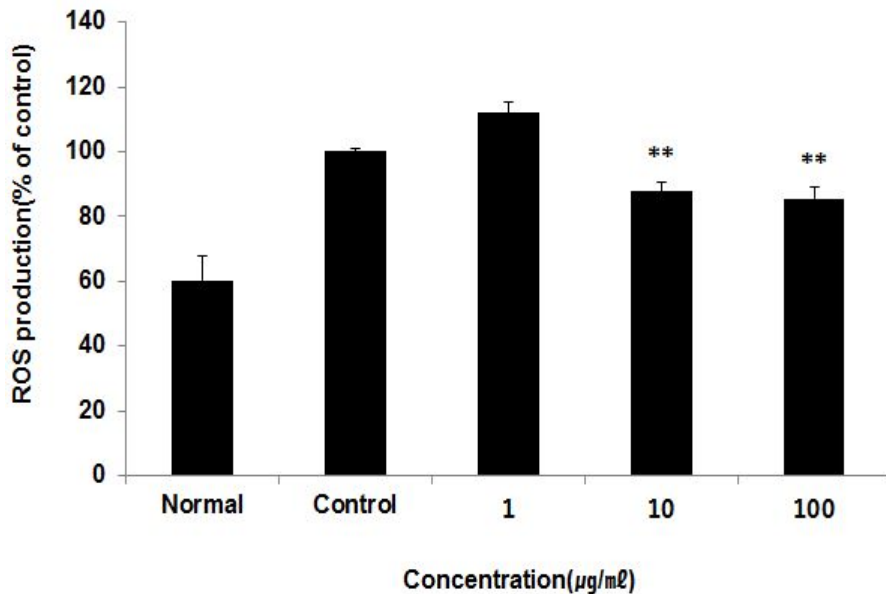


Figure 4. Effect of *Akebia Quinata* extract on reactive oxygen species production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Akebia Quinata* extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** p <0.01).

C. 항염증 효과

1. 산화질소 (NO) 생성량

목통 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 산화질소 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때 목통 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 97.2 \pm 4.4%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 85.5 \pm 3.7%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 67.7 \pm 3.8%로 나타나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Figure 5).

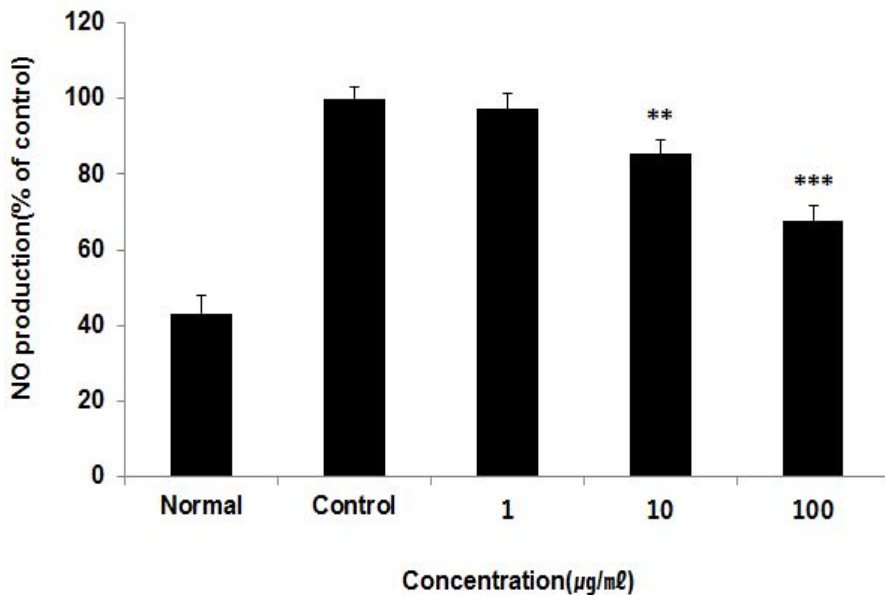


Figure 5. Effect of *Akebia Quinata* extract on Nitric Oxide production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Akebia Quinata* extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The NO production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** p <0.01, *** p <0.001).

2. 염증 사이토카인 (Cytokine) 생성량

a. Interleukin-6 (IL-6)

목통 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 IL-6 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때 목통 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 102.8 \pm 1.4%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 85.5 \pm 2.2%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 79.8 \pm 2.4%로 나타나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Figure 6).

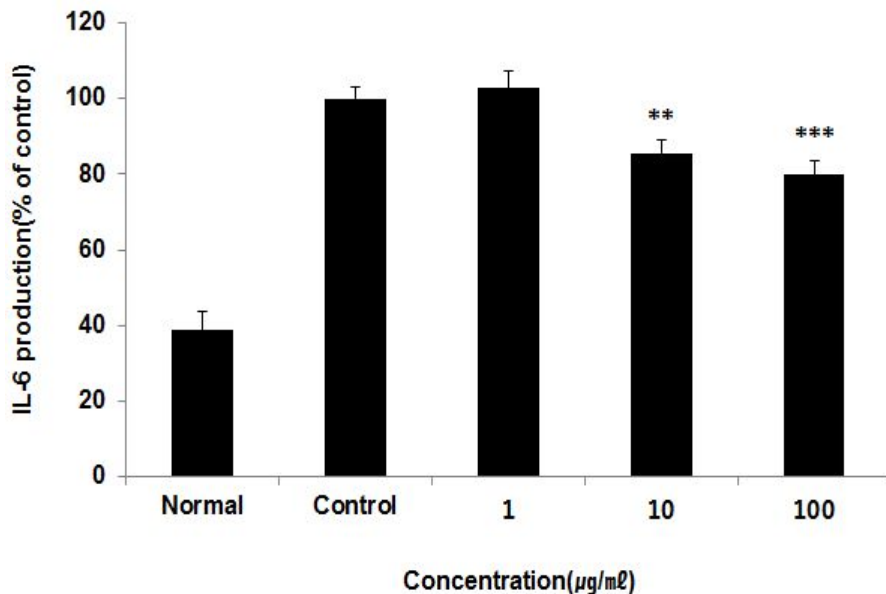


Figure 6. Effect of *Akebia Quinata* extract on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Akebia Quinata* extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The IL-6 production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** p <0.01, *** p <0.001).

b. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

목통 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 TNF- α 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때 목통 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 94.4 \pm 3.7%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 90.2 \pm 3.3%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 86.6 \pm 2.1%로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Figure 7).

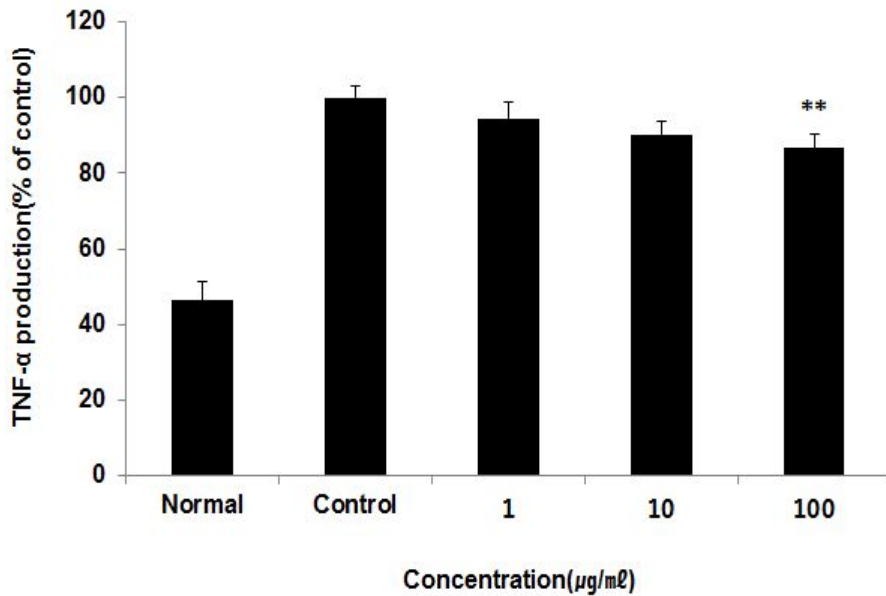


Figure 7. Effect of *Akebia Quinata* extract on TNF- α production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Akebia Quinata* extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The TNF- α production was analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** p <0.01).

D. 골관절염 동물에서의 효과

1. COX-2 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, COX-2 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 4.0\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $83.1 \pm 7.8\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $77.1 \pm 6.6\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 COX-2 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 8).

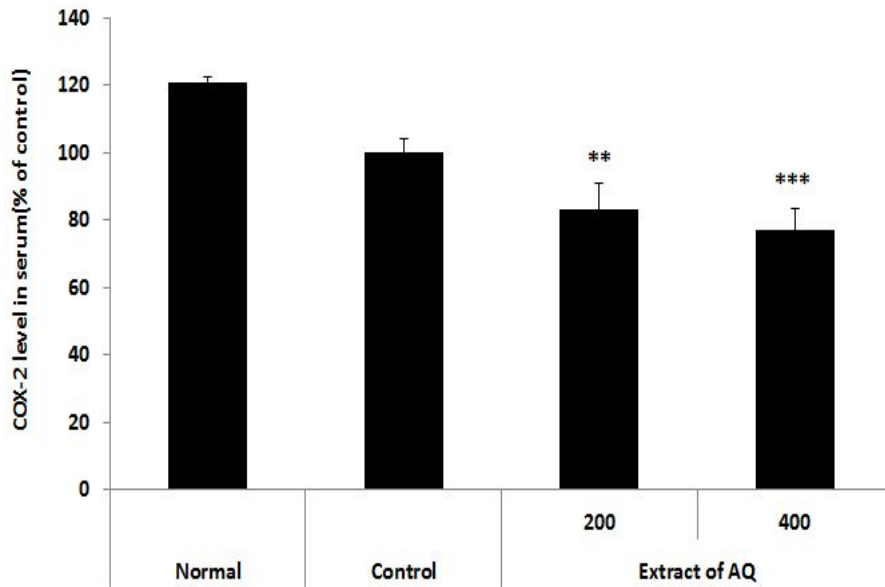


Figure 8. Effects of *Akebia Quinata* extract on cyclooxygenase-2 level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

2. MMP-2 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, MMP-2 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 5.4\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $71.4 \pm 8.6\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $76.8 \pm 7.7\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 MMP-2 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 9).

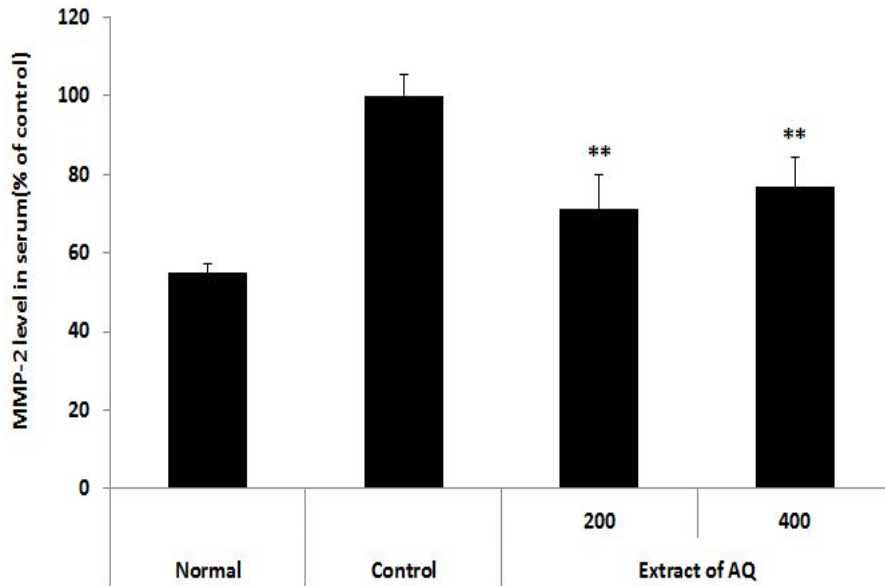


Figure 9. Effects of *Akebia Quinata* extract on matrix metalloproteinase-2 level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** $p < 0.01$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

3. MMP-9 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, MMP-9 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 100.0±4.5%로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 69.8±5.5%, 400 mg/kg 투여 그룹은 70.6±5.9%로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 MMP-9 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 10).

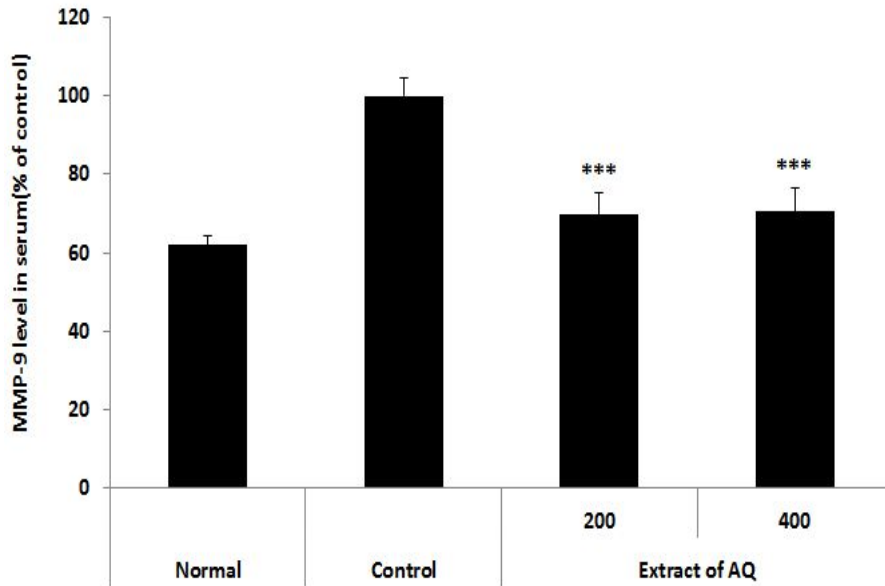


Figure 10. Effects of *Akebia Quinata* extract on matrix metalloproteinase-9 level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean ± S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (***) $p < 0.001$. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

4. TIMP-1 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, TIMP-1 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 9.4\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $78.5 \pm 10.2\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $85.3 \pm 5.5\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 TIMP-1 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 11).

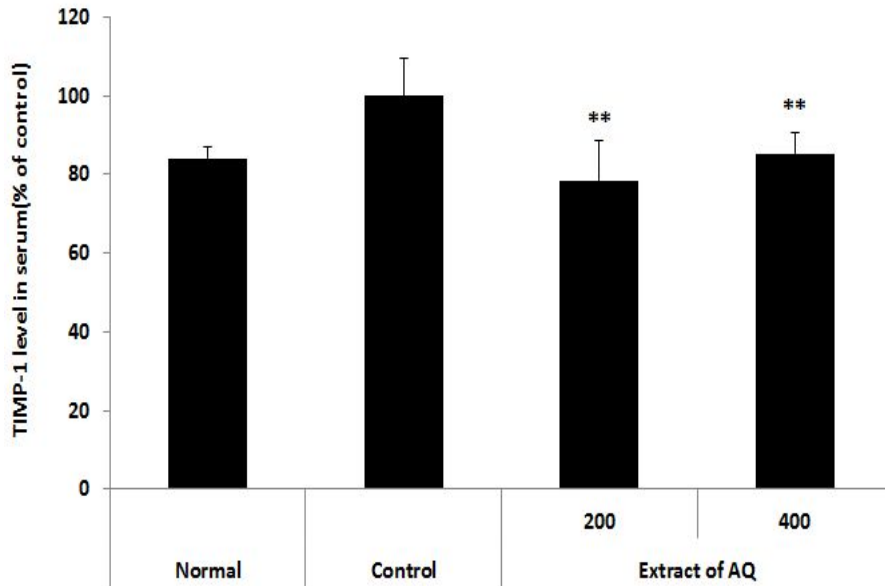


Figure 11. Effects of *Akebia Quinata* extract on TIMP-1 level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** $p < 0.01$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

5. CTXII 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, CTXII 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 100.0±7.2%로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 75.2±9.9%, 400 mg/kg 투여 그룹은 59.4±9.4%로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 CTXII 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 12).

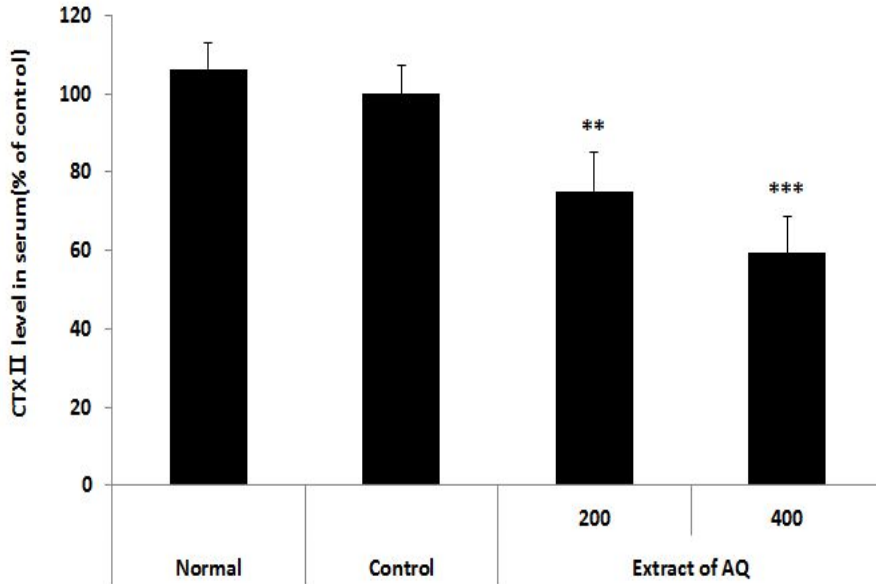


Figure 12. Effects of *Akebia Quinata* extract on C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean ± S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

6. COMP 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, COMP 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 100.0±7.0%로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 64.8±5.0%, 400 mg/kg 투여 그룹은 43.2±6.8%로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 COMP 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 13).

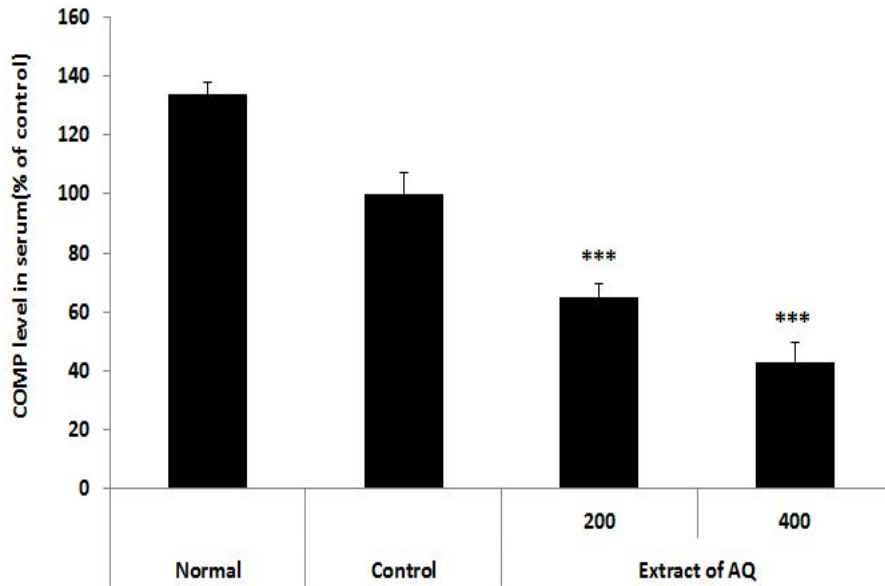


Figure 13. Effects of *Akebia Quinata* extract on COMP level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean ± S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (***) $p < 0.001$. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

7. LTB₄ 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, LTB₄ 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 100.0±10.9%로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 82.7±10.5%, 400 mg/kg 투여 그룹은 85.5±11.4%로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 LTB₄ 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 14).

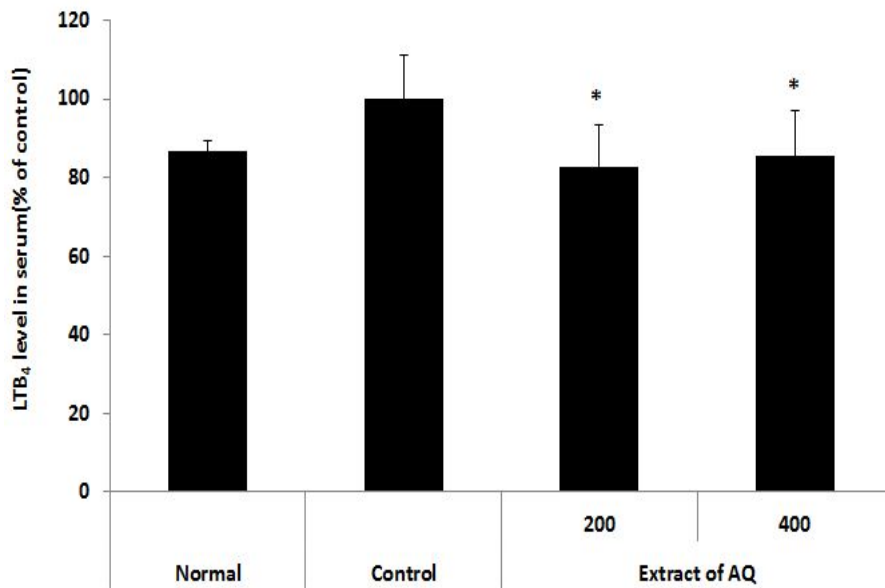


Figure 14. Effects of *Akebia Quinata* extract on LTB₄ level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean ± S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (* $p < 0.05$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

8. CRP 수치

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, CRP 수치는 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 2.3\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $104.4 \pm 3.5\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $96.3 \pm 1.1\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 CRP 수치가 대조군과 차이가 나타나지 않았다(Figure 15).

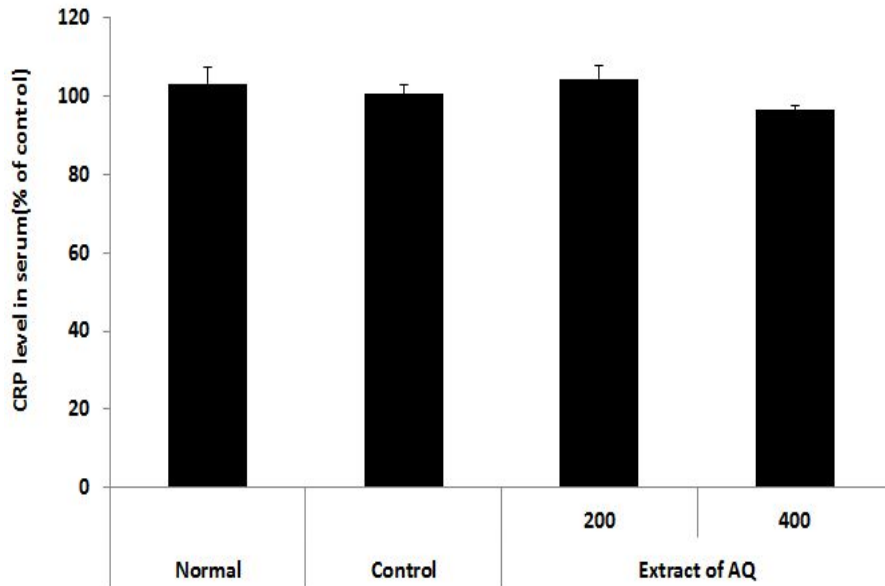


Figure 15. Effects of *Akebia Quinata* extract on CRP level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

9. 칼시토닌 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 칼시토닌 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 4.4\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $110.1 \pm 5.8\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $124.6 \pm 6.2\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 칼시토닌 생성을 유의성 있게 증가시켰다(Figure 16).

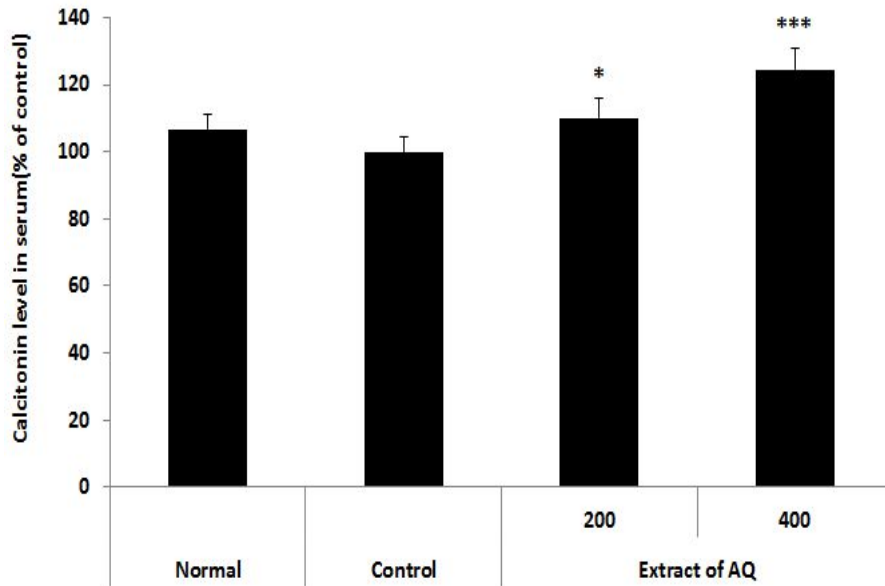


Figure 16. Effects of *Akebia Quinata* extract on calcitonin level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$). Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

10. 아그레칸 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 아그레칸 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $93.0 \pm 2.5\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $94.9 \pm 1.6\%$ 로 나타나, AQ 투여 그룹은 아그레칸 생성이 대조군과 차이가 나타나지 않았다. (Figure 17).

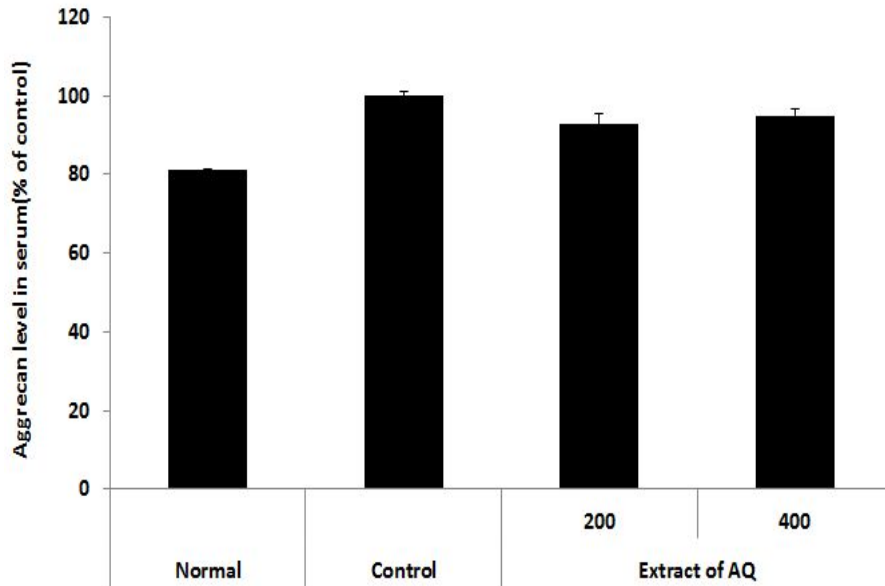


Figure 17. Effects of *Akebia Quinata* extract on aggrecan level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

11. 글리코사미노글리칸 생성량

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 글리코사미노글리칸 생성은 골관절염만을 유발한 대조군을 $100.0 \pm 1.3\%$ 로 나타내었을 때 목통 추출물 200 mg/kg 투여 그룹은 $169.0 \pm 3.5\%$, 400 mg/kg 투여 그룹은 $163.3 \pm 4.1\%$

로 나타나, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 글리코사미노글리칸 생성을 유의성 있게 증가시켰다(Figure 18).

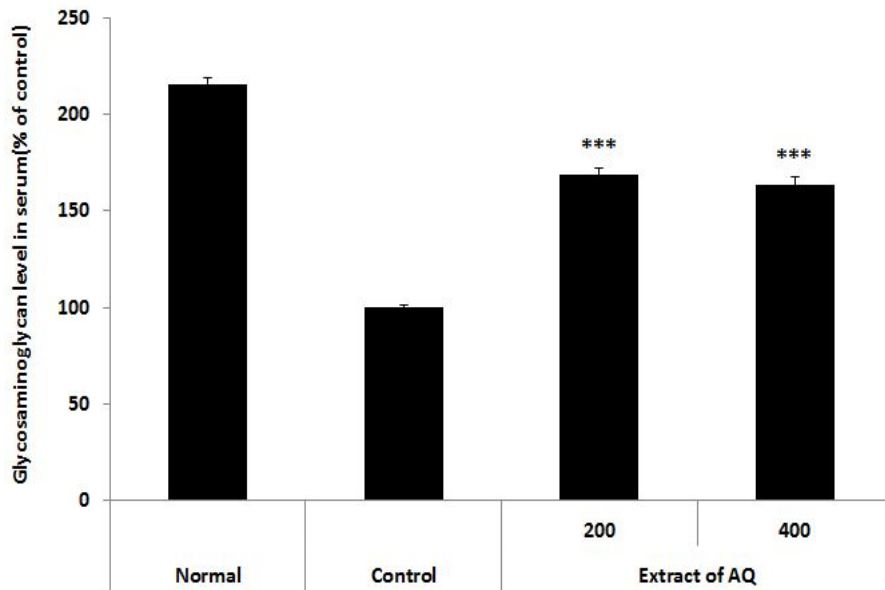


Figure 18. Effects of *Akebia Quinata* extract on glycosaminoglycan level in serum of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test, (***) $p < 0.001$. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

12. 컴퓨터단층촬영

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 정상 그룹에 비해 대조군의 연골이 많이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, AQ 추출물 200mg/kg과 400mg/kg 투여 그룹에서 대조군에 비해 연골 양이 더 보존되었다. 또한 대조군은 정상 그룹에 비해 대퇴골의 하단 측의 골의 부식과 파괴가 심하게 일어난 반면, AQ 추출물 200mg/kg과 400mg/kg 투여 그룹은 골의 부식이나 파괴가 적게 일어났다(Figure 19).

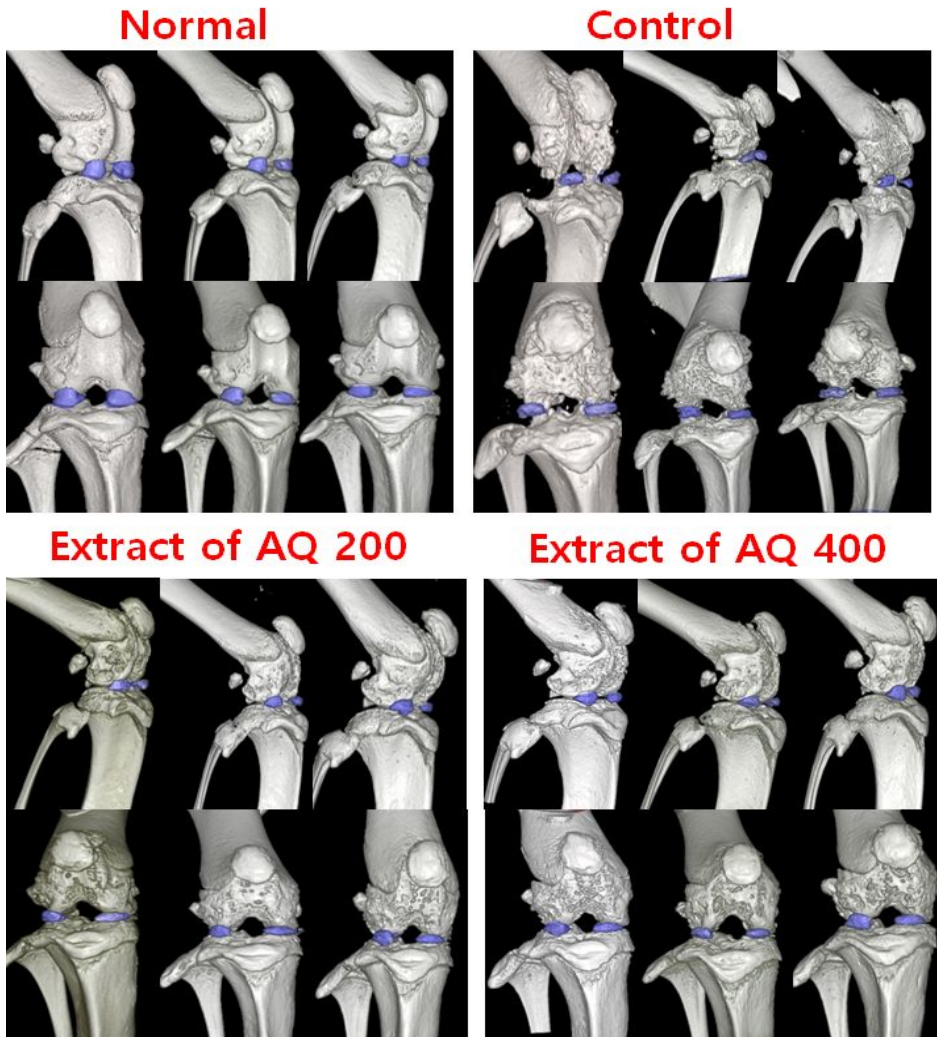


Figure 19. Effects of *Akebia Quinata* extract on imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

13. 조직검사

목통 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 대조군은 대퇴골과 경골 사이의 연골(원형 표시)이 많아 있는 것이 관찰되었으나 AQ 투여 그룹은 상대적으로 연골이 보존되어 있음이 확인되었다. 또한, AQ 투여 그룹은 대조군에 비해 연골 주변에 프로테오글리칸의 형성(화살표)이 많이 되어 있음이 확인되었다(Figure 20).

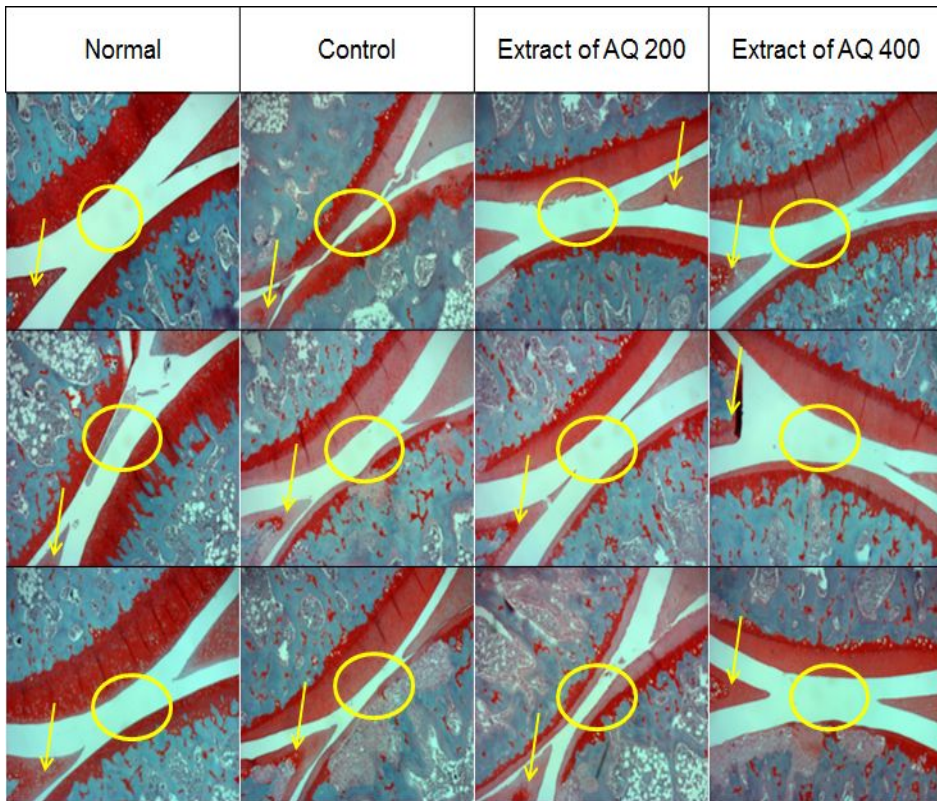


Fig. 20. Effects of *Akebia Quinata* extract on joint pathology(Safranin-O staining) from joint of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. Normal, Normal SD-rat group; Control, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group; Extract of AQ 200, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 200 mg; Extract of AQ 400, MIA (60 mg/ml)-induced osteoarthritis group + *Akebia Quinata* extract 400 mg.

IV. 고찰

의료가기술의 발달과 충분한 영양섭취로 인해 수명이 향상되면서 유엔 고령사회 기준에 따라 우리나라도 고령화 사회에 진입하면서 통계청이 발표한 ‘2015년 인구주택총조사 전수부문’ 결과에 따르면 전국 모든 시도가 65세 이상 고령인구 비율이 7%를 넘는 고령화사회에 진입했음을 보여주었다. 65세이상 고령인구는 2010년에는 536만 명(11.0%)이었으나 2015년에는 657만 명으로 전체인구의 13.2% 차지하고 있다[16]. 이처럼 고령화가 진행됨에 따라 골관절염 환자 및 그에 따른 진료비 또한 증가하여 국내에서 골관절염으로 치료받는데 쓰인 진료비는 2011년 9,468억여 원에서 2015년 11,632억여 원으로 증가하였다[3]. 국민건강영양조사[17]에서 골관절염 환자는 만 50세 이상에서 여자 32.5%, 남자 14.7%로 여자가 월등히 높았고, 특히 노령화될수록 유병률도 높아져 65세 이상은 37.8%로 보고되었다[18].

노령화 인구가 점점 늘어나는 우리나라의 현재 추세에서 관절염에 대한 관심이 더욱 커지고 있으며, 식약청은 2010년 허가된 60건의 천연물 의약품 중 관절염 치료제가 42건(70%)으로 가장 많았다고 보고하였고[19] 허 등[20]은 8년 동안의 국민건강영양조사에서 골관절염이 국내에서 가장 높은 유병률을 보였으며, 특히 65세 이상 여성 59.9%가 골관절염을 앓아 동일 연령층 남성에 비해서도 최대 8배까지 높은 유병률을 보여 고령화가 빠르게 진행되는 우리나라에서 골관절염 치료에 대한 연구가 필요한 실정이라고 하였다.

골관절염은 여러 기계적인 자극이나 염증으로 연골기질의 손상 또는 변화로 시작되어, 이에 대한 연골세포의 반응으로 cytokine이 작용하여 연골세포의 이화 및 동화 작용이 나타나는데[2], 이 중 이화 작용이 증가하여 관절 기질의 중요 요소인 프로테오글리칸의 합성과 분해의 균형이 깨어져 발생한다고 알려져 있다[21,22].

골관절염의 병태 생리는 여러 주장과 가설이 있을 수 있는데 크게 두 가지로 살펴볼 수 있다.

첫째, 연골기질(cartilage matrix)의 손상과 변화로 여러 기계적인 자극이나, 염증으로 인한 효소 반응, 대사의 변화 등으로 시작되며, 기질고분자(matrix macromolecule)의 격자가 파괴되고, 수분 함량의 변화가 일어난다.

둘째, 조직의 손상에 대한 연골세포의 감소로 연골세포가 조직손상이나 변화를 감지하면서 시작되는데 동화작용 및 이화작용이 모두 증가된다.

이는 주로 IL-1과 종양괴사 인자인 TNF- α 와 같은 cytokine에 의해 이뤄지는 파괴와 재형성 과정이며[23,24], TNF- α 가 연골세포의 이화작용 및 파괴에 관여하는 매우 중요한 효소로 작용을 하게 된다[25]. 또한, 관절염 환자의 특징으로 알려진 IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질로 골관절의 염증반응에 주된 매개 작용을 하여 혈청 및 관절염으로 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가하며, 골관절염의 활성도와 연관성이 있다[26,27]. 또한 Katherine 등[28]은 IL-6이 활액막이나 관절조직의 혈관에서 분비되어 혈청에서보다 관절액에서 더 높은 활성도를 보인다고 하였는데, 이는 IL-6이 골관절염에서 면역반응의 매개체로서 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다. 이 밖에도 단핵구, 대식세포에서 분비되는 다양한 사이토카인이 면역반응이나 세포 성장, 분화 등에 관련하고 염증반응을 매개하여 관절염을 악화시키는 요인으로 작용하게 된다[29,30].

골관절염 치료에 있어서 glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, hyaluronate 등의 약물 치료제에 대해서는 그 효능에 대한 검증이 충분히 이루어지고 있지 않으며 소염진통제의 경우는 장기간 복용시 위장관의 부작용을 일으킬 우려가 있고 소염진통제 중 위장관 부작용 개선 작용이 있는 COX-2 선택적 억제제는 고혈압, 울혈성 심부전, 신장 부작용 등을 유발할 수 있을 뿐 아니라 글리코사미노글리칸의 합성율을 오히려 감소시켜 관절염의 진행을 가속시킨다는 보고가 있다[31-34]. 외과적인 치료인 관절성형술, 관절경 미세천공술 등은 연골 수복을 기대하고 있으나 수복된 섬유연골 반흔조직들이 생역학적으로 불안전하여 추적관찰시 관절연골이 더욱 손상되고 관절염이 진행되는 보고가 있어[35], 골관절염에 대한 보다 안전하고 효과적인 치료가 필요한 실정이다. 조인스정(Joins®)은 기존의 소염진통제와 마찬가지로 관절의 염증부위에 침투하여 항염, 진통작용을 발휘하는 약물이다. 위령선, 과루근, 하고초로 구성된 천연물 의약품으로, 기존 관절염 치료제에 비해 위장관계 및 심혈관계 이상반응이 적다고 보고[36]되었음에도 불구하고 골관절증 환자에 대한 국내 제 3상 임상시험 결과 이약을 투여한 환자의 18.4%에서 시험약물과 관련된 이상반응이 발생하였으며, 그중 소화불량, 속쓰림, 상복부 불편감, 위장장애 등의 소화기계 증상과 안면 또는 수부 부종이 자주 발생하는 것으로 나타났다[37]. 이러한 이유로 천연물을 이용한 지속적인 연구 등 한·양방을 막론하고 보다 안전하고 효과적인 약물의 개발에 노력을 기울이고 있는 실정이다.

본 연구에 사용한 목통(木通, *Akebia Quinata*)의 선행 연구로는 목통 추출물의 항산화 작용 및 아질산염 소거작용[38], 목통의 항균효과[39], 목통의 항산화 및 항염작용[40]

등의 보고가 있었으나 아직 관절염에 대한 연구는 진행된 바가 없었다. 이에 따라 본 연구에서는 목통 추출물에 대한 관절염 효능을 객관적으로 확인하고자 *in-vitro* 실험을 통해 세포 독성, 항산화 및 항염증 효능과 MIA로 골관절염을 유발하기 2주 전부터 경구 투여를 실시한 흰쥐를 활용하여 골관절염과 관련된 다양한 인자들을 육안적, 혈액학적, 방사선 및 조직학적으로 골관절염을 억제하고 치료 효과를 확인하였다.

본 연구에서 사용한 목통 추출물의 안전성 검증을 위해 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다.

RAW 264.7 세포 활성화에 이용한 lipopoly saccharide (LPS)는 동물 실험에서의 자가면역 질환 유발 물질로, 대식세포를 자극하여 IL-1을 분비시켜 TNF- α 분비를 유발하고 PGE2 생성을 증가시킨다[41]. 골관절염 유발 물질로 사용된 MIA는 관절연골 세포의 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발 실험에서 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등이 인체의 골관절염과 매우 유사하다고 알려져 있다[42]. MIA 주입 7일째에는 윤활막과 주위 조직 내에서 변형이 발생하고[43] 프로테오글리칸의 소실[44]과 연골 및 연골하골의 기질 붕괴가 일어나며, 금속효소 및 MMPs, 아교질 분해 효소, gelatinase의 활성이 증가한다[45]. 또한 파골세포와 골아세포의 활동이 증가하면서 관절 연골의 소실로 인해 연골하골에 부하가 증가하는 것이 관찰 되었으며[46], MIA를 주입하는 2주 동안에도 실험군은 계속 목통 추출물을 경구투여 하였다.

항산화 물질의 가장 특징적인 것은 유리기와 반응하는 것으로, 활성 radical에 전자를 공여하는 radical소거 작용은 항산화 효과와 인체에서의 노화 억제 척도로 이용된다[47]. 본 연구에서 목통 추출물이 항산화 작용에서 어떤 영향을 미치는가를 실험한 결과 총 폴리페놀 함량 (mg/g)을 분석한 결과, 10 mg/ml 농도에서 280.7 \pm 1.7 mg/g의 총 폴리페놀 함량이 나타났으며, 총 플라보노이드 함량 (mg/g)을 분석한 결과 10 mg/ml 농도에서 101.3 \pm 0.5 mg/g의 총 플라보노이드 함량이 나타났다.

DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 항산화성 물질과의 반응을 통해 수소원자를 받아들여 고유의 정색성을 잃는 것을 이용한 방법으로, 항산화 효능의 정도를 알 수 있다[48]. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 분석한 결과 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가 하였으며, 활성산소(ROS) 생성량을 분석한 결과 LPS만을 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다. 실험 결과에서 목통 추출물이 항산화 효과가

있는 것이 밝혀졌으며, 박 등[38]의 연구에서도 항산화 효과가 있음을 나타냈다.

염증반응을 조절하는 NO는 두 개의 원자로 이루어진 매우 불안정한 free radical로 혈관 확장, 신경 전달 체제, 항균 물질,면역조절 등에 관여한다[49,50]. 과량 생성되면 TNF- α , IL-1 및 IL-6 등 pro-inflammatory cytokine 뿐만 아니라 COX-2 같은 염증 매개 물질도 과량 생산하여, 과도한 면역 반응을 일으킨다[51]. NO가 다량 생성되면 reactiveoxygen species (ROS)도 같이 생성된다[52,53]. 본 연구에서 목통 추출물이 항염증 효과를 나타내는 실험에서 산화질소(NO) 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

Cytokine인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6은 염증성 활막에서 다량 생산되어 기질의 합성을 저해하고 분해를 촉진하며, PGE₂는 활막 섬유아세포에 작용하여 파골세포의 생성을 유도해서 골관절염을 일으키는 것으로, cytokine의 억제제가 관절염 치료에서 중요한 역할을 한다[54,55]. TNF- α 는 염증반응을 유발하는 인자로, 반응이 시작되면 다른 염증 매개 인자들과 함께 증상을 악화시킨다.[56] IL-6는 B세포의 증식, 분화, 항체 형성에 관여하는 물질로 IgM, IgG, IgA의 증식을 유도하고 T세포 분화 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다[57,58]. IL-6 생성에 대한 AQ의 항염증 대한 효과를 실험하여 Interleukin-6 (IL-6) 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다. TNF- α 는 면역 반응의 초기에 분비되어, 염증의 활성화, 호중구 활성화, 단백질합성, 세포 고사 등의 역할을 하는 상위 cytokine으로 IL-1, IL-6, IL-8 및 MMPs와 같은 하위염증매개물질의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고 활막세포의 증식을 항진시켜 관절연골기질로부터 프로테오글리칸의 소실을 증가 및 재합성 억제를 통해 관절연골을 손상시키고 골관절염의 진행을 유도한다[59,60]. 한편 IL-1 β 와 TNF- α 는 작용이 서로 유사하거나, 상호 의존적인 것으로 보이며 IL-1 단독으로는 연골세포의 사멸을 유도할 수 없고, TNF에 의해 유발된 인자가 필요하다고 보기도 한다[61]. 골관절염의 발병과 관련된 인자들을 크게 분류해 보면 단백질 가수분해효소, 사이토카인, 그리고 산화질소가 주요 인자들로 알려져 있다[62-65]. 이 중 염증성 매개체 중 NO는 혈관의 긴장, 신경 전달, 면역 기능에서 중요한 역할을 하며 류마티스 관절염 및 골관절염 등과 같은 질병의 다양한 과정동안 과량 생산된다[66]. NO의 과생산은 조직 및 신경의 손상을 일으키고, 유전자를 변이시키며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키는 등 과도한 염증 반응을 일으킨다. 또한, 인체에 염증이 발생하면 염증의 병리기전에서 가장 중요한 물질인 PGE₂가 대식세포의 COX-2에 의해 매우 빠르게 생성된다[67]. NO는 백혈구가 염증부위로 이동하는 초기단계에 많은

역할을 하는 반면 PGE₂는 발열과 통증이 나타나는 후반부에 주로 작용하며[68], 골극(osseophytes)을 형성하여 비정상적인 골 성장 및 통증을 나타내며 이러한 증상은 골관절염에서 흔히 발생하는 것으로 알려져 있다[69].

TNF- α 는 면역반응 초기에 분비되어 IL-1, IL-6, IL-8 및 MMP 등의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키며, 관절 연골 기질의 proteoglycan 소실 증가 및 재합성 억제를 통해, 관절연골을 손상시켜 골관절염을 진행시킨다[70,71].

목통 추출물에 대한 항염증 실험에서 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 생성량을 분석한 결과, LPS만을 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

이처럼 cytokine을 측정 한 결과를 해석해보면, 항염증 대한 효과로 인하여 목통 추출물이 골관절염에 효과적인 물질임이 본 실험을 통하여 나타냈다.

Prostaglandin, leukotriene과 같은 불포화지방산은 cytokine이나 호르몬 등에 의해 분비가 되는데, 이중 Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 COX의 활성화의 주요 산물로 염증 시 주변 조직을 파괴하고 골관절염의 통증을 야기하는데 많은 관련이 있다[72-76].

목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, COX-2 생성은 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다. 현재까지 밝혀진 염증성 전이의 일반적 기전은 일차적으로 주변 세포의 침습에 의해 기저막과 세포외기질 단백질을 분해 하는 매우 복잡한 과정을 거치게 되는데, 이 과정에서 MMPs는 제4형 콜라겐과 fibronectin을 분해하고 신생혈관 형성을 억제 하여 염증의 전이 및 침습을 유도한다. 따라서 MMP는 류마티스성 관절염, 폐기종, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 중앙혈관신생 등의 병리과정에서 이상발현이나 활성화가 과다하게 유도된다[77,78]. 염증성 관절에서 연골 및 골 파괴에 중요한 역할을 하는 것이 Matrix metallo-proteinase(MMP)는 단백 분해 효소이며, 그 작용은 Tissue inhibitor of metallo-proteinases(TIMP) system에 의해 길항 된다 본 연구에서는 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, MMP-2 생성은 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 목통 추출물 투여 그룹은 MMP-2 생성을 유의성 있게 감소시켰다. MMP의 분비를 제어하고 활성도를 조절하는 TIMP는 교원질 및 단백 다당과 같은 세포외 기질성분을 분해하는 효소로, 골관절염의 병인에 중요한 역할을 한다. TIMP는 동물세포의 MMP의 작용을 조절하는 내재성 억제제로, 그 중 TIMP-1은 많은 MMP의 활성부위에 결합하여 그들의 활성을 거의 비가역적으로 저해하므로 기질의 이화작용이 가속화되는 골관절염과 같은 질환에서 MMP :TIMP 비율의 변화가 나타난다고 알려져 있다[79,80].

목통 추출물이 연골 내 기질 파괴에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 내

MMP-9와 TIMP-1의 생성량을 관찰한 결과, 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 MMP-9, TIMP-1, 생성을 유의성 있게 감소하여 프로테오글리칸의 분해와 파골세포의 분화를 감소시켜 연골 및 골을 보호하는 효과가 있음을 알 수 있다. 이처럼 세포기질의 항상성은 단백질 분해에 관여하는 MMP와 내분비 억제인자인 TIMP의 상호작용에 의해 유지되며 이 과정을 통해 광범위한 세포외기질의 분해 및 재구성이 이루어진다[81].

연골손상 지표인 COMP (cartilage oligomeric matrix protein)는 연골에 포함되어 있는 단백질 성분으로, 혈액 속의 COMP의 양을 측정을 통해 연골 상태와 퇴행, 손상 및 진행 여부 등을 진단하는데 활용되고 있다. 또한, CTX-II (C-telopeptide of type II collagen) 검사는 골관절염 평가를 위한 주요 바이오 마커 중 하나로 혈액과 소변을 통해 연골 마모 정도를 측정하는 검사이다[82,83]. 골관절염이 발생하여 연골이 마모되면 방출되는 특정 단백질의 수치를 지표로 나타내며 수치가 높을수록 골관절염의 진행이 빠르게 진행된다고 알려져 있다[84,85]. 본 실험에서 목통 추출물을 골관절염 유발 2주전부터 투여한 결과, CTX II, COMP 생성은 골관절염만을 유발한 대조군보다 목통 추출물 투여 그룹에서 CTX II, COMP 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

LTB₄는 lipoygenase의 활성화에 따른 주요 산물로서 염증반응에서 호산구 및 호중구에 대하여 강력한 유주성 특성을 갖는 성분으로 알려져 있으며, 세포의 화학주성에 필요한 여러 인자들과 세포부착인자의 발현에 영향을 주어 치주염, 류마티스관절염 및 다수의 염증성 질환에 핵심적 기능을 하는 인자이다[86,87]. LTB₄는 과도하게 생산되면 염증성 질환을 악화시키고, 류머티스 관절염의 관절액에서 백혈구 수, 면역복합체의 농도 등과 상관관계를 나타내는 인자로 알려져 있으며, LTB₄의 생산저해제 투여가 류머티스 관절염에 억제효과가 있다고 보고되었다[87,88] 본 실험에서 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, LTB₄ 생성은 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 목통 추출물 투여 그룹이 LTB₄ 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

CRP (반응성단백)는 대표적인 급성기 반응물질로 염증이나 조직 손상에 반응하여 양이 증가하거나 감소하게 되는데, 이러한 이유로 CRP는 급성기 반응물질이라 불리는 여러 단백질중 하나로 감염질환 및 염증의 변화를 감시하는데 사용된다. 본 실험에서 사용된 표준 CRP 검사는 단백질을 더 정확히 검출할 수 있는 측정 방법이며[89], Madhok 등[90]의 연구결과에서 혈청 내 IL-6의 농도와 서로 연관되어 있다고 알려져

있다. 본 실험에 사용한 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, CRP 수치는 골관절염만을 유발한 대조군과, 목통 추출물 투여 그룹간에 CRP 수치가 차이가 나타나지 않았다.

Calcitonin은 갑상선에서 분비되는 호르몬으로 혈중 칼슘의 농도가 증가하였을 때 분비되어 혈중 칼슘을 뼈로 유입하는 작용을 한다. 이러한 작용으로 인해 calcitonin은 뼈에서 칼슘의 손실을 예방하거나 치료하는 목적으로 사용된다. 사람의 갑상선에서 생성되는 호르몬으로, 생체 내의 칼슘 이온농도의 항상성을 조절하는 데 관여하는 calcitonin 에 대해 실험한 결과 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, MMP-9 생성은 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 목통 추출물 투여 그룹이 calcitonin 생성을 유의성 있게 증가시켰다.

아그레칸은 연골의 세포 외 매트릭스에서 발견되는 주요 구조 프로테오글리칸으로 연골 구조에 대한 중요한 구성 요소와 관절의 기능이다. 연골기질의 주요한 성분의 하나로서, 연골 형성 지표 (aggrecan) 활성 측정은 연골의 항상성 유지에 중요한 연골세포의 변화와 사멸로 인하여 collagen type II, aggrecan, SOX 9 등 세포 외 기질의 생산이 감소하고 분해가 촉진되면 연골의 기본구조가 파괴되어 관절은 체중부하를 견디지 못한다[91]. 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 아그레칸 생성은 골관절염만을 유발한 대조군과 목통 추출물 투여 그룹간에 아그레칸 생성의 차이가 나타나지 않았다.

글리코사미노글리칸은 산성뮤코다당이라고도 한다. 히알루론산을 제외한 글리코사미노글리칸은 그 환원말단부분에서 ‘가교구조’ 라는 특이구조부위를 매개로 하여 코어단백질에 결합해 프로테오글리칸의 일부를 이루고 일반적으로 조직에 존재한다. 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 글리코사미노글리칸 생성은 골관절염만을 유발한 대조군에 비해 목통 추출물 투여 그룹에서 글리코사미노글리칸 생성을 유의성 있게 증가시켰다.

실험 종료 후 무릎관절의 연골파괴정도를 알아보기 위하여 컴퓨터단층촬영을 진행하여 목통 추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 정상 그룹에 비해 대조군의 연골이 많이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 목통 추출물 투여 그룹에서 연골 양이 더 보존되었다. 또한 대조군은 정상 그룹에 비해 대퇴골의 하단 측의 골의 부식과 파괴가 심하게 일어난 반면, 목통 추출물 투여 그룹은 골의 부식이나 파괴가 적게 일어났다.

실험 종료 후 병리조직학적 소견을 관찰하기 위하여 시행한 조직검사서 목통

추출물을 골관절염 유발 2주 전부터 투여한 결과, 대조군은 대퇴골과 경골 사이의 연골이 닳아 있는 것이 관찰되었으나 목통 추출물 투여 그룹은 상대적으로 연골이 보존되어 있음이 확인되었다. 또한, 목통 추출물 투여 그룹은 대조군에 비해 연골 주변에 프로테오글리칸 형성이 많이 되어 있음이 확인되었다.

이와 같은 실험결과에 의해 목통 추출물이 항염증 및 항산화 작용뿐만 아니라 진통 작용 및 뼈와 연골의 침윤을 감소시켜 골관절염의 진행을 지연하며 연골 파괴를 방어하는 효과가 있음을 의미한다.

이상의 연구 결과를 종합하면 목통 추출물의 투여가 RAW 264.7 세포에서 항산화 및 항염증 효과를 확인할 수 있었고, MIA로 골관절염을 유발한 흰쥐에서 골관절염 발생의 원인인 염증매개 인자 발현을 억제하고 골 대사와 관련된 인자들에 대한 효능을 통해 연골의 변성 및 파괴를 방지하여 골관절염의 진행을 억제하고 프로테오글리칸의 소실을 줄임으로써 골관절염을 지연하고 완화하는 효과가 있는 것으로 증명되었다. 따라서 임상적 범주로 확장하는 추가연구를 통하여 향후 골관절염 기능성 식품의 원료로 이용될 수 있으리라 사료된다.

VI. 결론

본 연구는 목통의 증류수 추출물을 가지고 관절염에 대한 예방 및 완화의 효능을 검증하고자 in-vitro 실험을 통해 독성 검사 및 항산화, 항염증 효능을 확인하고 in-vivo 실험을 통한 다양한 관절염 인자들을 혈액 및 방사선, 조직학적 방법을 통해 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 목통 추출물은 RAW 264.7 세포에서 독성을 나타내지 않아 안전한 것으로 확인되었다.

2. 목통 추출물은 총 폴리페놀 함량이 280.7 ± 1.7 mg/g로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 101.3 ± 0.5 mg/g으로 나타났다.

3. 목통 추출물은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 농도 의존적으로 증가하였으며, 대조군에 비해 ROS 생성을 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.

4. 목통 추출물은 대조군에 비해 NO 및 IL-6 생성을 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있게 감소시켰으며, TNF- α 생성은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소시켰다.

5. 목통 추출물의 200, 400 (mg/kg) 경구 투여 그룹은 대조군에 비해 COX-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, CTXII, COMP, LTB4 생성을 유의성 있게 감소시켰으나, CRP 수치는 차이가 나타나지 않았다.

6. 목통 추출물의 200, 400 (mg/kg) 경구 투여 그룹은 대조군에 비해 calcitonin, glycosaminoglycan 생성을 유의성 있게 증가시켰으나, aggrecan 생성은 차이가 나타나지 않았다.

7. 목통 추출물의 200, 400 (mg/kg) 경구 투여 그룹은 대조군에 비해 연골량, 대퇴골 하단 측의 부식이나 파괴가 적게 일어났다.

8. 목통 추출물의 200, 400 (mg/kg) 경구 투여 그룹은 대조군에 비해 연골이 더 많이 보존되어 있으며, 연골 주변의 proteoglycan 형성이 많이 되어 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, in-vitro 실험을 통해 목통 추출물이 독성 검사를 통해 안전한 것으로 확인되었으며, 골관절염에 대한 다양한 원인 중 항산화 및 항염증 효능이 확인되었다. 이를 바탕으로 진행한 in-vivo 실험을 통해 검증된 골관절염 병리인자에 대한 결과는 목통이 골관절염 질환을 억제하고 완화 하는 효능을 가지고 있음을 뒷받침해주고 있다. 따라서 추후 전임상 결과를 바탕으로 임상 연구와 더불어 심도 있는 연구가 진행된다면 목통이 골관절염에 대한 기능성 식품의 원료로서 활용될 수 있다고 판단된다.

참고문헌

- [1] WHO. Chronic rheumatic conditions.2011.Available from :<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
- [2] 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사; 2006. pp.253-61, p.517.
- [3] 건강보험심사평가원이 최근 5년간(2011~2015년)건강보험 및 의료급여 심사결정 자료를 이용하여 ‘퇴행성관절염(M15~M19), 상병 청구현황을 분석한 결과.
- [4] Korean College of Rheumatology. KCR textbook of rheumatology. Seoul: Koonja; 2014.
- [5] Yang CH. Gastrointestinal disorders associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Dongguk J Med 2003;10(2):190-9.
- [6] 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 2003. pp.1167-9.
- [7] Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patient swithadvanced osteo arthritis. Arthritis Rheum. 2002;46(3):704-13.
- [8] Auw Yang KG, Saris DB, Dhert WJ, Verbout AJ. Osteoarthritis of the knee: current treatment options and future directions. CurOrthop. 2004;18(4):311-20.
- [9] Yang CH. Gastrointestinal disorders associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Dongguk J Med. 2003;10(2):190-9.
- [10] Han JD, Shin JH, Hwang HC, Kim DY, Cho WH, Im GI. Interaction of cytokines in osteolysis. J Korean Orthop Res So. 2000;3(2):125-32.
- [11] Lee JW, Do JH. Market trend of health functional food and the prospect of ginseng market. J Ginseng Res. 2005;29(4):206-14.
- [12] Kim HK. Current status and prospect of nutraceuticals. Food Ind Nutr. 2004;9(1): 1-14.
- [13] 대한약전의한약(생약)규격집. p268
- [14] 이영노. 원색 한국 식물도감. 서울: 교학사; 1997.
- [15] 허준. 동의보감. 서울: 북경당; 1983.
- [16] 통계청: <http://blog.naver.com/hmj2815/220808093476>
- [17] 진수희. 2009년 국민건강통계. 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009). 서울:보건 복지부 건강정책과. 2010:66

- [18] 김현아. 퇴행성 관절염의 임상연구. 대한류마티스학회지. 2000;7(3):205-11.
- [19] 식약의약품안전청. 보도자료. 식품의약품안전청 생약제제과. 2011:1-6.
- [20] 허남욱, 최찬범, 엄완식, 배상철. 국민건강영양조사를 이용한 한국인 관절염의 유병률 현황과 연도별 변화. 대한류마티스학회지. 2008;15:11-25.
- [21] Hulejová H, Barešová V, Klézlb Z, Polanská M, Adama M, Šenolta L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007;38(3):151-6.
- [22] López-Armada MJ, Caramés B, Martín MA, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* .2006;14(10):1011-22.
- [23] Patrick D. Wall, Ronald Melzack, 통증학 편찬위원회편. *Textbook of pain I* . 서울: 정담. 2002:575-89.
- [24] 한태륜, 방문석. 재활의학 셋째판. 서울:군자출판사; 2009. pp.905-8.
- [25] 이삼규. 단일관절염 유발 백서에서의 관절통의 동적 정량화. 전북대학교대학원 의과대학 박사학위논문. 2002.
- [26] Simi T. Inhibition of IL-6, IL-10 signaling and star activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol*. 2000;165:5227-37.
- [27] Jacqueline Uson, Alejiandro Balsa. Dorsa Pascal-Salcedo : Soluble IL-6 receptor and different arthropathies, *J. Rheumatol*. 1997;24:2069-75.
- [28] Katherine L, Manson Terry L, Moor James M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol*. 1994;21:2359-63.
- [29] Conti P, Bouch9er W, Letourneau R, Feliciani C, Reale M, Barbacane RC, Vlagopoulos P, Bruneau G, Thibault J, Theoharides TC. Monocyte chemotactic protein-1 provokes mast cell aggregation and [3H] 5HT release. *Immunology*. 1995;86(3):434-40.
- [30] Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA(May 1992). Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med*. 1992;175(5):1271-5.
- [31] 이도영, 문호생, 조규형, 천정은. 슬관절 퇴행성 관절염에 대한 글루코사민의 효

- 과. 대한슬관절학회지. 2001;13(1):130-6.
- [32] 양창현. 흔히 접하는 비스테로이드성 항염증약물과 위장관 질환. 동국의학. 2003;10(2):190-9.
- [33] 이운중. 골관절염의 치료. 대한내과학회지.2004;67(5):564-7.
- [34] Huskisson EC, Berry H, Gishen P, Jubb RW, Whitehead J. Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1995;22(10):1941-6.
- [35] 배대경, 정기웅, 김진문, 권창혁, 박용구. 미세천공술 후 재생된 연골의 면역조직 화학적 염색 결과. 대형외과연구학회지. 2000;3(1):1-4.
- [36] 김윤경. 가감파 창방의 현대적 의미. 한국한의학연구원 연구보고서 전통적 임상 기술의 보호 및 BD구축(I). 2003;12:127-37.
- [37] SK 케미칼. 2011. Available from: http://www.skchemicals.com/korean2/product/life/pharm/Medicine01_04.asp.
- [38] 박찬성. 한약재 추출물의 항산화 작용 및 아질산염 소거작용. 한국식품저장유통학회. 2006;12(6):631-636
- [39] 황현익, 이인순, 김지은, 문혜연. 으름덩굴의 항균 성분 분리 및 함량분석. 한국생물공학학회. 2002;12:253-6.
- [40] Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong. S. C., Reddy. N., Bartlett. J., Smith. P.T., Shanmugam. K., Munch. G., Wu. M.J., & Satyanaraynan. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2012;12:173.
- [41] Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1993;93(2):206-11.
- [42] 조형준, 장종범, 정재욱, 성상철, 김태균. 한국의 고령인구에서 방사선학적 평가에 의한 슬관절 퇴행성 관절염의 유병율. 대한슬관절학회지. 2009;21:223-31.
- [43] Bove S.E, Calcaterra S.L, Brooker R.M, Huber C.M, Guzman R.E, Juneau P.L, Schrier D.J, Kilgore K.S. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium

- iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(11):821-30.
- [44] 김환영, 최진봉. 봉독약침과 녹용약침이 MIA 유도 골관절염 흰쥐에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*. 2010;20(1):61-77.
- [45] Janusz M.J., Hookfin E.B., Heitmeyer S.A., Woessner J.F., Freemont A.J., Hoyland J.A., Brown K.K., Hsieh L.C., Almstead N.G., De B., Natchus M.G., Pikul S., Taiwo Y.O. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9:751-60.
- [46] Guzman R.E, Evans M. G, Bove S, Morenko B, Kilgore. K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in sub chondral bone and articular cartilage of rat femoro tibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol*. 2003;31(6):619-24.
- [47] Ahn SI, Heung BJ, Son JY. Antioxidative activity and nitrite scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J. Food Cookery Sci*. 2007;23:19-24.
- [48] Kim SJ. DPPH radical scavenging and ACE inhibitory effects of the aerial parts of *Fagopyrum esculentum*, and isolation of flavonoids. MS thesis. Suncheon National Univ. 2004.
- [49] Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-42.
- [50] Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):434-56.
- [51] Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci*. 1997;61(21):2073-81.
- [52] Brune B, Zhou, and A. Von Knethen. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl*. 2003;84:4-22.
- [53] Delanty, N. and M. A. Dichter. Oxidative injury in the nervous system *Acta Neurol Scand*. 1998;98:53-145.
- [54] 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.
- [55] Ji H, et al. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody induced arthritis. *J Exp Med*. 2002;196:77-85.

- [56] Chung KF, Barnes PJ. Cytokine in asthma. *Thorax*. 1999;54(1):825-57 .
- [57] Mori, L. et al. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1(TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol*. 1996;157:3178-82.
- [58] 조동, 강경희, 장명웅 뇌수막염 환자의 뇌척수액에서 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 의 변화. *대한면역학회지*. 1999;21(2):99-107.
- [59] Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-74.
- [60] 임창경. 이보산의 항류마티즘 효능에 대한 연구. *대한한의학회지*. 2009;17(1):99-111.
- [61] Caramés B, López-Armada MJ, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Vaamonde C, Galdo F, Blanco FJ. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(6):715-22.
- [62] Wu W, Xu X, Dai Y, Xia L. Therapeutic effect of the saponin fraction from *Clematis chinensis* Osbeck roots on osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate through protecting articular cartilage. *Phytother Res* 2010;24(4): 538-546.
- [63] Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets*. 2007;8(4):493-500.
- [64] Herrington C, Hall PA. Molecular and cellular themes in inflammation and immunology. *J Pathol*. 2008;214(2):123-5.
- [65] Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sam D, Calatroni A. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem*. 2009;106(1):83-92.
- [66] Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*. 1998;41(7):1141-51.
- [67] Rice-Evance C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997;2(4):152-9.
- [68] Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem*

- 2001;49(7):3420-4.
- [69] Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1789-803.
- [70] Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370(9602):1861-74.
- [71] 임창경. 二妙散의 항류마티즘 효능에 대한 연구. 대한한의학회지. 2009;17(1):99-111.
- [72] Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine.* 2008;14(10):461-9.
- [73] Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem.* 1999;271(1):18-28.
- [74] Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PR. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-73.
- [75] Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, Fikrig E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(3):187-91.
- [76] Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine.* 2008;14(10):461-9.
- [77] Francoz D, Desrochers A, Simard N, Saint Pierre Y, Fecteau G, Latouche JS, Fortin M. Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid from healthy calves and calves with experimentally induced septic arthritis. *Am J Vet Res.* 2008;69(8):1022-8.
- [78] Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol.* 1996;149(1):273-82.
- [79] Kontny E, Rudnicka W, Kowalczewski J, Marcinkiewicz J, Maslinski W. Selective inhibition of cyclooxygenase 2-generated prostaglandin E2 synthesis in

- rheumatoid arthritis synoviocytes by taurine chloramine. *Arthritis and Rheumatism*. 2003;48(6):1551-5.
- [80] Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, Fikrig E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(3):187-91.
- [81] 권태동, 김기훈. 생약복합제제가 토끼의 퇴행성관절염 개선에 미치는 영향. *한국영양학회지*. 2012;45(5):437-42.
- [82] 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 Rheum*. 2004;50(8):2471-8.
- [83] Garnero P, Peterfy C, Zaim S, Schoenharting M. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(9):2822-9.
- [84] Elsaid KA, Chichester CO. Review: collagen markers in early arthritic diseases. *Clin Chim Acta*. 2006;365(1-2):68-77.
- [85] 백대현, 장주혜, 하기용. 흰쥐에서 LeukotrieneB4와 ThromboxaneB2가 요추 신경근에 미치는 영향. *대한척추외과학회지*. 2001;8(1):8-14.
- [86] Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem*. 1999;271(1):18-28.
- [87] Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15(5):623-724.
- [88] Griffiths RJ, Smith M, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, Scampoli DN, Eskra JD, Byrum RS, Koller BH, McNeish JD: Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J Exp Med*. 1997;185:1123-9.
- [89] Yeo HJ, Lee JH, Lee HJ, Byun KS, Im HJ, Kim MJ. Microvascular findings in patients with rheumatoid arthritis: assessed, using fundus photography and fluorescein angiography. *J Rheum Dis*. 2013;20(4):231-7.

- [90] Madhok R, Cilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(3):232-4.
- [91] Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003;31:619-624.