

초록입홍합추출오일복합물(관절팔팔)이 Monosodium Iodoacetate로 퇴행성 관절염을 유도한 흰쥐의 연골 및 관절에 미치는 영향 효능 평가

조 세 행
연세중앙내과의원

Effect of Green Lipped Mussel Extract Oil Complex (Gwanjeolpalpal) on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Animal Model

Se Haeng Cho
Yonsei Medical Clinic

ABSTRACT This study examined the effect of green lipped mussel extract oil complex (GLMOC; green lipped mussel oil, olive oil, and D- α -tocopherol) on the joints and cartilage in an osteoarthritis-induced animal model. A total of 40 seven-week-old Sprague-Dawley rats were divided randomly into 5 groups; 1) normal, 2) control, 3) GLMOC 32.5 mg/kg, 4) GLMOC 65 mg/kg, 5) GLMOC 130 mg/kg. Osteoarthritis was induced by injection of monosodium iodoacetate (MIA) into the knee joints of the rats. The rats were sacrificed at the end of 4th week after daily administration of GLMOC and then rat tibial articular cartilage was removed. Serum NF- κ B was measured by ELISA and the expression levels of type I, II collagen, matrix-metalloproteinase (MMP)-2, 9 mRNA were analyzed by qPCR. The morphological changes in the joint were evaluated by micro-CT and staining with H&E and Safranin-O & Fast Green. No adverse events were observed during the experiment period. GLMOC significantly inhibited serum NF- κ B level in rats with MIA-induced osteoarthritis. Expression of the catabolic genes of MMP-2 and MMP-9 were lower in the cartilage of the animals fed GLMOC. A histological examination of animals showed that GLMOC administration improved the lesions significantly. Bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular number (Tb.N) were increased in rats fed GLMOC compared to the control group and bone surface/bone volume (BS/BV) was decreased significantly. These results suggest that GLMOC effectively protects the joints and cartilage by suppressing inflammatory responses and cartilage destruction.

Key words: green lipped mussel extract oil complex, Gwanjeolpalpal, osteoarthritis, cartilage

서 론

만성 퇴행성 질환 중 하나인 골관절염(osteoarthritis)은 관절 연골의 점진적인 소실로 인한 염증성 질환으로 통증, 관절강직 및 부종(edema) 등이 동반된다. 주로 경추, 요추, 무릎, 고관절 및 손가락과 같이 장기간 지속적인 스트레스를 받은 관절에 많이 발생한다(1). 골관절염은 나이의 증가에 따라 유병률이 증가하는 질환 중 하나로 50세 이상의 연령대에서 급격하게 증가하며 특히 65세 이상에서 약 80% 이상의 높은 유병률을 나타낸다(2). 2013년에 보건복지부에서 발표한 국민건강통계에 따르면 만 50세 이상의 골관절염 유병률이 전체 12.5%였으며, 남성이 5.1%, 여성은 18.9%로 여성의 골관절염 유병률이 남성보다 13.8% 높았고 연령이 높아질수록 유병률이 증가하는 것으로 나타났다(3). 영양

상태의 개선 및 의료기술의 발달로 인해 수명이 증가하면서 우리나라도 고령화 사회에 진입하고 있으므로 골관절염 환자의 수가 대폭 증가할 전망이다.

관절염의 수술적 치료 방법으로는 관절경 수술, 절골술, 다발성 천공술, 관절 성형술, 인공 관절 대체술 등이 있으나, 수술 과정 및 재활에 있어 출혈이나 감염 등의 합병증 발생 위험이 있고 특히 고령자일수록 이러한 합병증은 증가하는 것으로 알려져 있다(4). 약물학적 관리 방법으로는 acetaminophen, ibuprofen, naproxen, indomethacin과 같은 비스테로이드성 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 히알루론산(hyaluronic acid) 등 증상 개선에 초점을 맞추는 방법을 사용하고 있지만, 소화기-심혈관계 부작용, 과민반응, 면역체계 약화와 같은 부작용을 일으킬 우려가 있다(5-7). 이러한 실정 때문에 안전하면서 효능이 입증된 영양 보충제나 건강기능식품과 같은 대체 의학에 대한 기호도 및 수요가 증가하고 있다. 관절 건강에 도움을 준다고 알려진 glucosamine sulfate, chondroitin sulfate 등의 영양 보충제 및 건강기능식품은 그 효능에 대

Received 8 October 2018; Accepted 22 January 2019

Corresponding author: Se Haeng Cho, Yonsei Medical Clinic, Seoul 04379, Korea

E-mail: chodoctor119@gmail.com, Phone: +82-2-794-5017

한 검증이 충분히 이루어지지 않았다고 밝혀진 바 있어 효능이 입증된 원료가 필요한 실정이다(8,9).

초록입홍합(*Perna canaliculus*, green lipped mussel)은 뉴질랜드 해안가에 서식하는 홍합으로 껍데기의 가장자리 부분이 초록색이어서 초록입홍합이라는 이름이 붙여졌다(10). 뉴질랜드 해안가에 거주하는 마오리족이 내륙에서 생활하는 마오리족들에 비해 골관절염이 훨씬 적게 발병하며, 이들이 초록입홍합을 생식한다는 연구 결과를 통해 초록입홍합이 골관절염에 좋다는 사실이 밝혀지면서 이를 기반으로 한 제품이 출시되기 시작했다(11). 초록입홍합은 docosaehaenoic acid(DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5n-3) 등의 오메가-3 계열 불포화지방산뿐만 아니라 phytosterols, furan fatty acid 등 다른 어유에는 없는 지질 성분들을 포함하고 있으며 이 성분들이 인체 건강에 유익한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(10,12). 이와 같은 지질 성분들은 초록입홍합을 냉동했을 때보다 동결 건조했을 때 약 5배 더 추출된다고 보고되었다(13). 초기에는 증기 공정을 포함한 제조 공정으로 인해 유효성분이 안정화되지 않은 초록입홍합 제품이 생산되었기 때문에 동물실험 및 임상시험 등에서 효능을 보이지 않았다(5,14-17). 이후 지속적인 연구를 통해 1980년대에 초록입홍합의 유효성분을 안정화할 수 있는 동결 건조 방법이 개발되어 특허를 획득하였고, 초록입홍합에서 항염증 효능을 갖는 성분만을 분리 및 추출하는 기술이 개발되었다(18). 이전에 발표된 연구에 따르면 안정화된 초록입홍합 추출물은 관절염 동물 모델, 관절염 환자뿐만 아니라 개의 관절염 치료에도 효과가 있다고 밝혀졌다(6,12,15). 안정화된 초록입홍합 기반 제품은 관절염에 대한 식이보충제로 여러 나라에서 판매되고 있으며(19), 국내에서는 식품의약품안전처로부터 관절 건강에 도움을 줄 수 있는 개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 최초로 인정받아 판매되고 있다. 초록입홍합오일은 cyclooxygenase(COX)와 5-lipoxygenase(LOX-5)의 활성을 유의하게 억제하여 prostanoids와 leukotrienes의 발현을 감소시킴으로써 항염증 효능을 나타낸다고 보고되었다(19). 그러나 골관절염의 주요 원인 중 하나인 연골 파괴 및 보호 과정에서는 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 골관절염을 유도한 동물 모델에서 관절관찰의 원료인 초록입홍합추출오일복합물 투여에 따른 염증성 사이토카인, 연골 파괴 정도, 연골조직 합성 및 분해 관련 유전자, 뼈 부식 정도의 변화를 확인함으로써 초록입홍합추출오일복합물이 골관절염에 미치는 영향과 골관절염의 주요 원인인 연골 파괴 과정에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

초록입홍합추출오일복합물(green lipped mussel oil

complex, GLMOC)은 (주)씨스팡(Seoul, Korea)으로부터 공급받은 관절관찰 제품(초록입홍합추출오일복합물 순도 100%)으로부터 얻었다. 초록입홍합추출오일복합물은 초록입홍합오일, 올리브유, D- α -tocopherol을 함유하고 있다.

실험동물 및 군 분류

본 연구의 동물실험은 동물보호법에 근거한 (주)바이오톡스텍(Cheongju, Korea)의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 170548). 실험동물은 7주령의 수컷 Sprague-Dawley(SD) rat(Orientbio Inc., Seongnam, Korea) 40마리를 cage에 2마리씩 넣고 일주일 동안 순화시킨 뒤 사용하였다. 사육실 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였고 물과 고형사료(Seoul Feed Co., Ltd., Incheon, Korea)는 자유롭게 공급하였다.

동물이 8주령이 되었을 때 각 군당 8마리씩 무작위로 다음과 같이 군을 분리하였다; 1) 정상군(normal), 2) 대조군(control), 3) 초록입홍합추출오일복합물(관절관찰, GLMOC) 저용량군(32.5 mg/kg), 4) GLMOC 중용량군(65 mg/kg), 5) GLMOC 고용량군(130 mg/kg). 정상군을 제외한 32마리 동물의 양쪽 뒷다리 관절강에 생리식염수에 용해한 mono-sodium iodoacetate(MIA)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.5 mL(MIA 60 mg/mL)를 단회 투여하여 골관절염을 유발하였다. 정상군은 생리식염주사액을 동물의 양쪽 뒷다리 관절강에 0.5 mL씩 투여하였다.

GLMOC군에는 시험물질인 초록입홍합추출오일복합물을 용량별로 4주간 1일 1회 경구 투여하였으며, 정상군 및 대조군은 부형제인 corn oil을 투여하였다. 시험물질 투여 28일차가 되는 날 2% isoflurane을 이용하여 모든 동물을 마취 사시킨 다음 동물의 양쪽 뒷다리를 채취하여 오른쪽 다리의 연골은 RNA 추출 전까지 -70°C 에 보관하였고 왼쪽 다리의 연골부터 경골까지는 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

혈액 중 nuclear factor-kappa B 측정

시험물질 투여 4일째에 경정맥에서 혈액을 채취한 후 원심분리기로 3,000 rpm, 15분간 원심분리(Combi-514R Hanil Science Industrial Co., Ltd., Gimpo, Korea) 하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청은 분석 전까지 -20°C 이하의 냉동고에 보관하였다. Nuclear factor-kappa B(NF- κ B)의 측정은 ELISA kit(Cusabio Biotech Co., Wuhan, China)의 매뉴얼에 따라 실시하였다.

연골조직에서 real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)에 의한 유전자 발현 측정

적출한 오른쪽 뒷다리 연골을 적출 당일 액체질소에 얼린 뒤 분쇄하여 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)의 매뉴얼에 따라 total RNA를 추출하였다. RT-PCR은 RNA와 각 pri-

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene	Accession No.	Sequence for primers (5'-3')	
Type I collagen	NM_053304	Forward	GCTTGAAGACCTATGTGGGTATAA
		Reverse	GGGTGGAGAAAGGAACAGAAA
Type II collagen	L-48440	Forward	CGAACCCAAAGGACCCAAATA
		Reverse	CGGACTGTGAGGTTAGGATAGT
MMP-2	NM-031054	Forward	CACCAAGAAGCTTCCGACTATCC
		Reverse	TCCAGTACCAGTGTCTCAGTATCA
MMP-9	U24441	Forward	CCCAACCTTTACCAGCTACTC
		Reverse	GTCAGAACCGACCCTACAAAG
β -Actin		Forward	CTTCCTTCCTGGGTATGGAATC
		Reverse	CTGTGTTGGCATAGAGGTCTT

mer(Table 1)를 이용하여 50°C에서 10분간 가열한 후, 95°C에서 1분, 95°C에서 10초, 60°C에서 30초의 순서로 40회 반복하였다.

영상학적 분석

조직 적출일에 모든 투여군을 안락사시킨 후 관절염을 유발한 왼쪽 뒷다리 대퇴골로부터 무릎 연골을 포함하여 경골까지 적출하였다. 적출한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 QRM micro-CT-HA phantom(QRM, Möhrendorf, Germany)을 사용하여 영상학적 분석을 시행하였다. 골밀도 영상은 Analyze 12(Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA)를 이용하여 3D 영상 분석을 하였다.

조직병리학적 검사

조직은 70% 에탄올에 세척 후 5% formic acid 용액에 7일간 탈회한 후, 70% 에탄올에 세척 및 수세 후 파라핀에 포매하여 4~5 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. Safranin-O & Fast Green 및 H&E staining 후 permount (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 봉입하여 현미경(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 사진 촬영을 하였다. 조직병리학적 분석은 형태학적 관찰을 통해 정상 0점, 가벼운 손상 1점, 중간 정도의 손상 2점, 심한 손상 3점, 매우 심한 손상 4점으로 간주하여 평가하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS(version 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 사용하여 검정하였다. 정상군과 대조군은 independent t-test를 실시하였고, 대조군과 시험물질 투여군(저용량군, 중용량군, 고용량군) 간의 유의성을 확인하기 위하여 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)를 실시하고 Dunnett's t-test의 다중 사후 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

체중 및 이상반응

실험 개시일부터 일주일에 2회씩 체중을 측정한 결과, 모

든 측정 시점에서 각 군 간의 통계학적으로 유의한 체중 변화는 없었다(Fig. 1). 관찰 기간 동안 모든 개체에서 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상이 관찰되지 않았으며 사망 동물도 발생하지 않았다.

혈액 내 nuclear factor- κ B 억제 효과

관절염의 투여가 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 관절염을 유발한 동물들에 초록입홍합추출오일복합물을 투여한 후 혈액을 채취하여 NF- κ B 농도를 분석하였다.

전사인자로서 면역 및 염증반응에서 중요한 역할을 하는 NF- κ B는 류마티스성 관절염, 골관절염, 죽상동맥 경화증, 천식, 염증성 장 질환 등의 다양한 질환의 유발 및 발병에 영향을 끼친다(20). NF- κ B는 염증성 사이토카인, 케모카인, 스트레스와 관련된 인자 등에 의해 발현이 촉진되며 관절염이 발생하면 연골 세포 및 활막 세포에서 활성화되어 연골 파괴 및 활막 염증에 관여하는 인자들의 생성을 유도한다(21). 본 실험에서는 초록입홍합추출오일복합물 투여군 저용량, 중용량, 고용량군 각각의 혈중 NF- κ B 농도가 대조군보다 감소하였으며 이 중 고용량군 투여군에서는 유의한

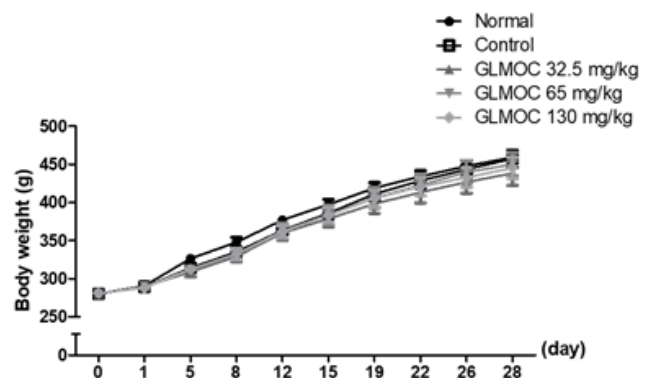


Fig. 1. Effect of green lipped mussel oil complex (GLMOC) on the body weights of MIA-induced osteoarthritis animal model. Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil; GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg.

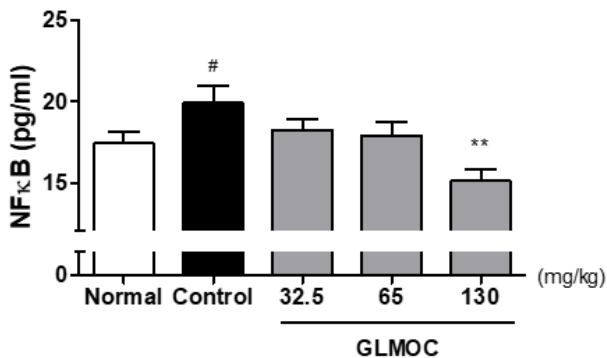


Fig. 2. Effects of green lipped mussel oil complex on serum NF-κB level of MIA-induced osteoarthritis animal model. Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil; GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg. Data represented mean±standard error. [#] $P<0.05$, significant difference from the normal group by independent t-test. ^{**} $P<0.01$, significant difference from the control group by Dunnett's one-way ANOVA.

차이를 보였다($P<0.01$)(Fig. 2). 본 실험 결과는 이전에 초록입홍합추출오일복합물이 NF-κB, MAPK signaling을 조절함으로써 TNF-α, IL-6, IL-1β 등의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킨다는 이전 연구 보고 결과를 뒷받침하는 것이다(22). 즉 초록입홍합추출오일복합물을 함유한 관절 팔팔은 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

연골조직 합성 및 분해 관련 유전자 조절 효과

골관절염은 연골조직에서의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 불균형으로 인한 연골조직 파괴에 의해 일어난다(23). 이전 여러 연구에서는 모두 염증성 사이토카인 억제에 초점이 맞추어져 초록입홍합추출오일복합물의 연골 보호 효과 기전에 대해서는 연구된 바가 없었다. 본 실험에서는 초록입홍합추출오일복합물이 골관절염을 유도한 동물 모델에서 연골조직의 합성 및 분해 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해 관련 유전자의 발현량을 측정하였다.

흔히 교원질이라고도 불리는 콜라겐(collagen)은 현재까지 29종이 보고되어 있으며, 종류에 따라 피부, 힘줄, 연골, 뼈 등 결합조직에 존재한다(24). 이 중 1형 콜라겐은 체내에 가장 많이 존재하는 유형으로 뼈와 진피에 주로 분포해 탄력성을 부여하고, 2형 콜라겐은 주로 연골조직에 분포하고 있으며 약 85~90%를 차지하고 있다. 이전에 발표된 연구 결과에서는 연골 손상이 진행되면서 1형 콜라겐과 2형 콜라겐이 부족해지면 골관절염이 유발된다고 보고되었다(25,26). 골관절염 유발 물질인 MIA 투여에 의해 1형 및 2형 콜라겐 감소는 정상군 대비 대조군과 초록입홍합추출오일복합물 투여군 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

관절염의 발생에 있어서 핵심적인 역할을 하는 효소 중

하나인 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 생체 내에서 extracellular matrix 단백질로 작용한다. MMP 계열은 현재까지 28종이 밝혀졌으며, 이 중 MMP-2와 MMP-9은 연골에서 collagen matrix를 분해하는 기질 분해효소로 작용한다(27). 관절염이 발생하면 MMP의 생성이 증가하면서 주변 조직을 파괴하기 때문에 MMP가 과다하게 발현되면 심각한 연골 손상을 불러일으킬 수 있다(28). 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염 환자에서 MMP-2, MMP-9 등의 발현이 증가한다고 보고되었다(29,30). 본 실험에서는 MIA로 퇴행성 관절염을 유도한 동물모델에 4주간 초록입홍합추출오일복합물을 경구 투여한 후 연골조직 내 MMP-2, MMP-9 mRNA 발현량을 측정하였다.

동물의 연골조직에서 MMP-2 mRNA 발현량을 측정한 결과, 정상군 대비 대조군에서 MMP-2 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였으나($P<0.05$) 초록입홍합추출오일복합물 섭취군에서는 유의한 변화가 없었다. MMP-9 mRNA 발현량의 경우 정상군 대비 대조군의 MMP-9의 발현이 증가하는 경향을 보였으며 초록입홍합추출오일복합물 고용량 섭취군에서 대조군 대비 유의하게 감소하였다($P<0.05$)(Fig. 3). 정상군과 초록입홍합추출오일복합물 고용량군 간 t-test 검정 시 유의한 차이가 없었으므로 발현량이 유사하다고 볼 수 있다($P=0.8794$). 이러한 결과를 통해 관절팔팔이 연골조직에 존재하는 콜라겐의 합성을 촉진하지는 않지만, 기질분해효소인 MMP의 발현을 감소시켜 연골 분해를 억제함으로써 연골을 보호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

연골조직 보호 효과

초록입홍합추출오일복합물이 MIA에 의한 연골조직 파괴를 억제하는지를 확인하고자 Hematoxylin & Eosin(H&E) 및 Safranin-O & Fast Green 염색법을 통해 연골조직을 관찰하였다. MIA는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 활성을 억제함으로써 연골 세포의 대사과정을 저해시켜 관절 연골의 변성을 일으켜 관절염을 유도한다(2). MIA 유발 골관절염 모델은 조직병리학적으로 사람의 퇴행성 관절염과 비슷한 것으로 알려져 있다(31). 골관절염의 가장 흔한 임상적 특징 중 하나인 활막 비대는 활막 및 활액에 생긴 염증에 의해 발생하는데, 이 증상은 MIA로 유발한 관절염 동물 모델에서 관찰할 수가 있다(32). 활막이 많이 형성되고 판누스(pannus) 같은 섬유조직이 형성되면 연골이 파괴되어 없어지고, 이는 관절의 뼈와 주변 조직을 손상하게 된다(33).

연골조직을 H&E로 염색한 후 100배 비율로 관찰한 결과, 대조군의 활막 과형성(synovial hyperplasia) 점수는 3.75 ± 0.16 인 데에 비해 초록입홍합추출오일복합물 저용량, 중용량, 고용량 투여군에서는 각각 2.70 ± 0.37 , 2.63 ± 0.32 , 2.38 ± 0.32 로 유의하게 감소하였다(각각 $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$). 판누스 형성(pannus formation) 점수의 경우 대조군이 3.63 ± 0.18 인 데에 비해 초록입홍합추출오일

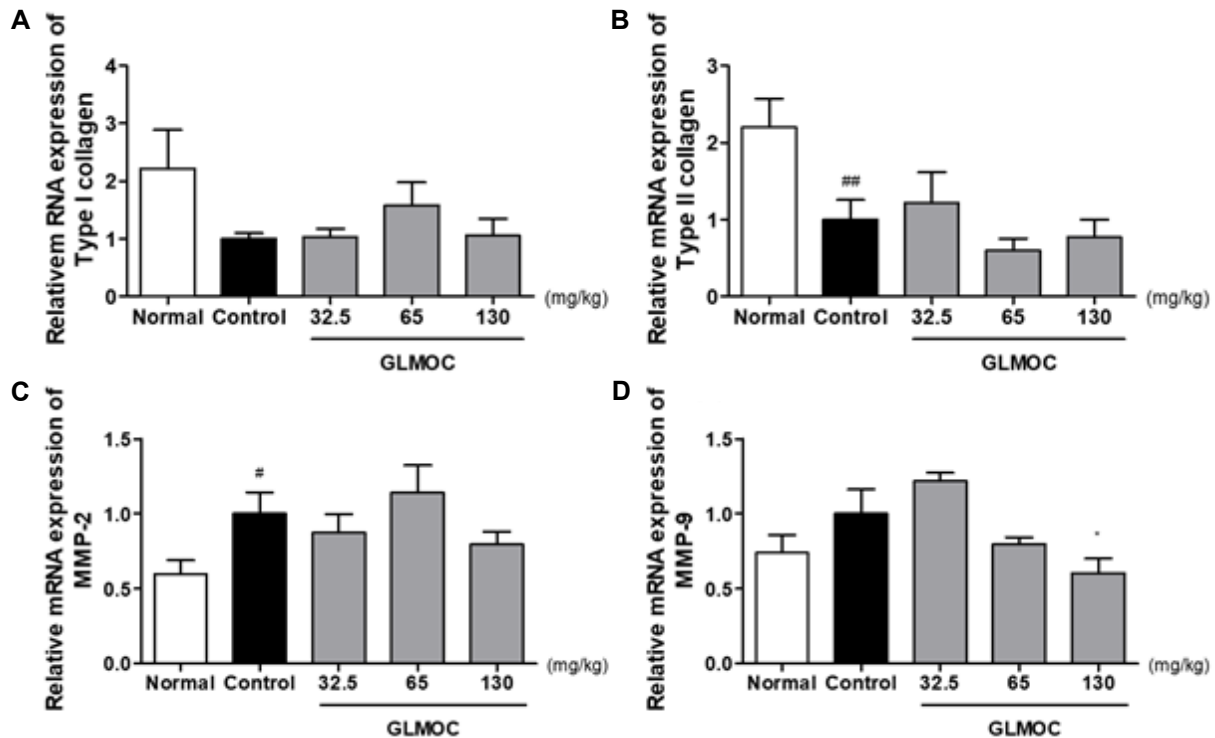


Fig. 3. Effects of green lipped mussel oil on the expression of type I collagen, type II collagen, MMP-2, and MMP-9 in cartilage of MIA-induced osteoarthritis animal model. Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil; GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg. Data represented mean±standard error. [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, significant difference from the normal group by independent t-test. ^{*} $P<0.05$, significant difference from the control group by Dunnett's one-way ANOVA.

복합물 투여군의 경우 저용량 2.75 ± 0.37 , 중용량 2.75 ± 0.25 , 고용량 2.25 ± 0.31 로 유의하게 감소하였다(각각 $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$). 대조군의 연골 파괴(cartilage destruction) 점수는 3.63 ± 0.18 이며, 시험물질 저용량, 중용량, 고용량군의 연골 파괴 점수는 각각 2.88 ± 0.30 , 2.25 ± 0.16 , 2.88 ± 0.30 으로 유의하게 감소하였다(각각 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$). 이 경우 초록입홍합추출오일복합물 중용량군에서 가장 효과가 좋아 보이나, 초록입홍합추출오일복합물을 섭취한 세 군 간에 ANOVA 통계 분석을 했을 때 군 간에 유의차가 없었다. 즉 일정한 효능 반응을 보였다고 할 수 있다. 뼈 부식에 대한 조직병리학적 점수의 경우 대조군(2.63 ± 0.42) 대비 초록입홍합추출오일복합물군에서 감소하는 경향(저용량, 중용량, 고용량군 각각 1.75 ± 0.49 , 1.50 ± 0.46 , 1.88 ± 0.52)을 보였다(Fig. 4A~4E).

관절 연골조직을 Safranin-O & Fast Green 염색한 결과, 정상군의 경우 연골조직 전체가 고르게 염색되었으나 대조군에서는 연골 대부분이 파괴되어 염색된 면적 및 염색 정도가 감소하였다. 고용량의 초록입홍합추출오일복합물 투여군에서는 대조군 대비 염색된 면적이 넓었으며 염색 정도도 진하게 관찰되었다(Fig. 4F).

본 연구 결과에서 MIA에 의한 퇴행성 병변이 대조군의 연골조직으로부터 관찰되어 골관절염이 유발되었음을 확인

할 수 있었다. 또한, 초록입홍합추출오일복합물이 관절염에 의한 활막 과형성 및 판누스 형성을 억제함으로써 연골 손상 및 뼈 부식을 저해하는 효과가 있음을 의미한다.

골 조직 보호 효과

골관절염은 과거에는 연골의 퇴행성 질환으로 간주하여 왔으나 현재는 관절 조직을 포함하는 전체 관절의 퇴행성 질환으로 인식되고 있다(34). 즉 골관절염에서의 병리학적인 변화는 연골과 뼈를 포함한 모든 관절 조직에서 나타난다. 골관절염이 진행되면 뼈의 미세 구조 특성이 변화하는데, 골 조직 비율 및 골 두께 등이 감소한다(35). 이전 연구에서는 발바닥 연부 조직의 염증 억제에 초점이 맞추어져 있어 골조직 보호 효과에 대한 연구 보고는 거의 없었다(22). 본 실험에서는 골관절염 유발에 의해 변화하는 골 미세 구조의 특성에 초록입홍합추출오일복합물이 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보고자 micro-CT를 이용하여 동물의 대퇴골 및 경골을 촬영하였다.

초록입홍합추출오일복합물을 골관절염 유발 동물 모델에 4주간 투여한 후 동물의 대퇴골 및 경골을 micro-CT 촬영한 결과, 정상군 대비 대조군의 해면골 조직 면적 비율(bone (trabecular) volume/total volume, BV/TV), 해면골 두께(trabecular thickness, Tb.Th) 및 해면골 수(trabecular

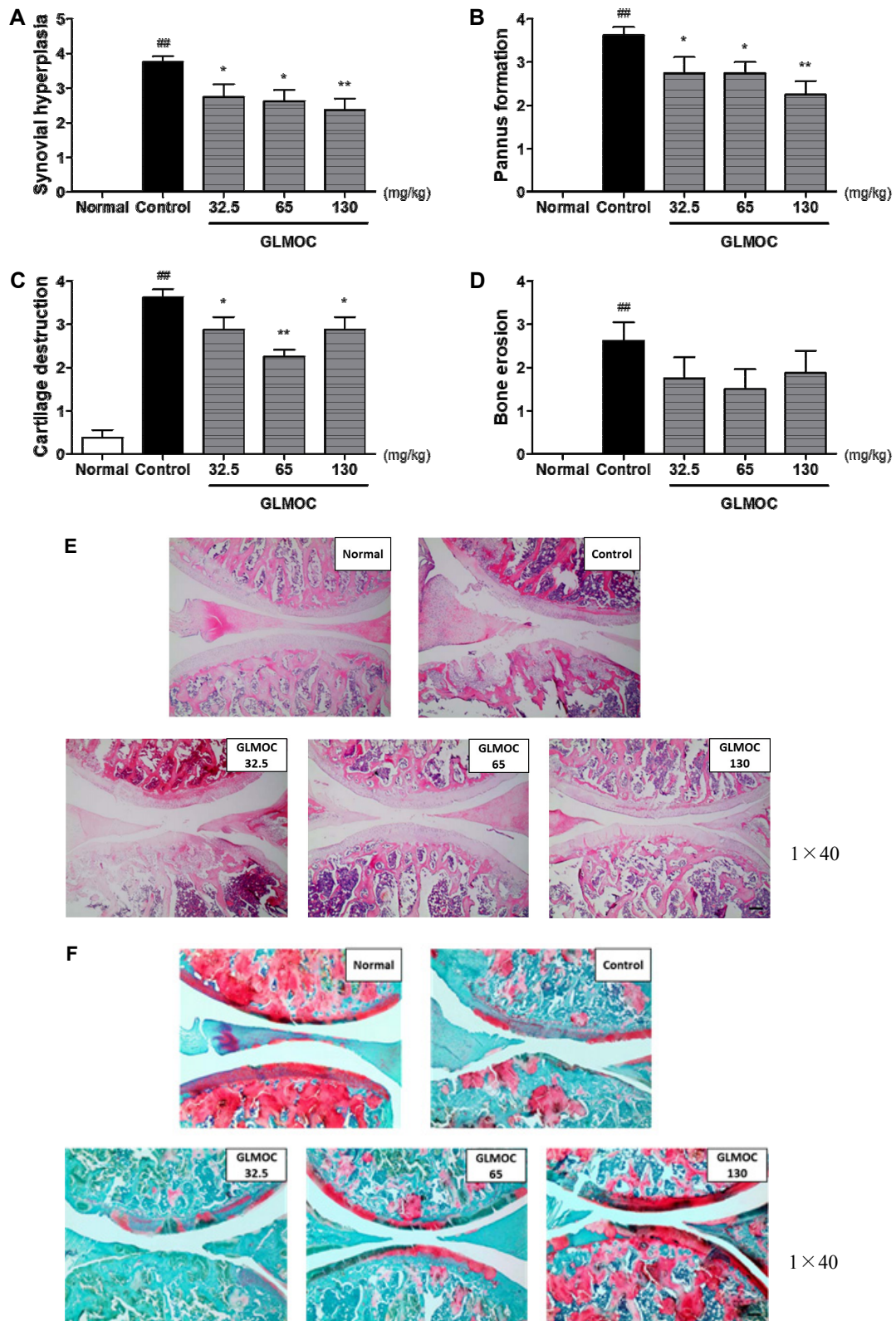


Fig. 4. Effects of green lipped mussel oil on joint pathology Hematoxylin & Eosin (A~E) and Safranin-O & Fast Green staining (F) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis animal model. Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil, GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg. Data represented mean±standard error. ^{###}*P*<0.01, significant difference from the normal group by independent t-test. ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, significant difference from the control group by Dunnett's one-way ANOVA.

Table 2. Mean data of cartilage micro-CT

	BV/TV (%)	BS/BV (1/mm)	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)
Normal	52.63±1.69	17.24±0.58	0.178±0.002	3.11±0.06
Control	39.70±1.75 ^{##}	22.67±0.91 ^{##}	0.153±0.003 ^{##}	2.31±0.10 ^{##}
GLMOC 32.5 mg/kg	42.27±2.28	21.70±0.85	0.172±0.011	2.61±0.17
GLMOC 65 mg/kg	44.76±2.07	21.76±0.70	0.160±0.005	2.80±0.09*
GLMOC 130 mg/kg	46.96±1.65*	19.85±0.53*	0.186±0.006**	2.93±0.16**

Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil; GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg.

BV/TV: bone (trabecular) volume/ total volume, BS/BV: bone surface/ bone volume, Tb.Th: trabecular number, Tb.N: trabecular number. Bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) were increased significantly in GLMOC 130 mg/kg group ($P<0.05$). Trabecular number (Tb.N) was increased significantly in GLMOC 65, 130 mg/kg group ($P<0.05$, $P<0.01$). Bone surface/bone volume (BS/BV) was decreased significantly in GLMOC 130 mg/kg group ($P<0.05$).

Data represented mean±standard error. ^{##} $P<0.01$, significant difference from the normal group by independent t-test. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, significant difference from the control group by Dunnett's One-way ANOVA.

number, Tb.N)가 유의하게 감소(각각 $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$)하였으며, 뼈 부식(bone erosion; bone surface/bone volume, BS/BV) 정도는 유의하게 증가하였다($P<0.01$). 초

록입홍합추출오일복합물군을 130 mg/kg 섭취한 군의 해면골 조직 면적 비율과 해면골 두께는 대조군 대비 유의하게 증가하였고(각각 $P<0.05$, $P<0.05$), 해면골 수의 경우 초록입홍합추출오일복합물 65, 130 mg/kg 용량으로 섭취한 두 군에서 대조군 대비 유의하게 증가하였다(각각 $P<0.05$, $P<0.01$). 뼈 부식의 경우 초록입홍합추출오일복합물 130 mg/kg 섭취군에서 대조군 대비 유의하게 감소하였다($P<0.05$) (Table 2, Fig. 5). 본 결과는 초록입홍합추출오일복합물이 골관절염 동물 모델에서 연골뿐만 아니라 관절에 포함된 뼈의 부식을 감소시키고 골 미세 구조 변화를 막는 효과가 있음을 의미한다. 초록입홍합추출오일복합물 투여는 다른 동물 실험에서도 항염증 효과가 입증되었다(22,36,37). Carrageenan에 의해 유도된 관절염 모델에서 발 부종 두께, 관절염 지수, PGE2, TNF- α , IL-1 β , COX-2 mRNA, iNOS mRNA 등도 유의하게 감소시켰다. 조직학적으로도 초록입홍합추출오일복합물은 염증 세포의 침윤을 유의하게 억제하였다. TNF- α 는 류마티스 관절염의 주요한 매개 물질로 활막증식, 뼈와 연골 손상, 전신 염증반응에 중요한 역할을 하며 IL-1 β 는 골 파괴를 유발한다(38). 현재 시판되고 있는 관절염 치료제 중 Etanercept®, Infliximab®, Adalimumab®가 TNF- α 차단제로, Anakinra®가 IL-1 β 저해제로 활용되고 있는 것만 보아도 초록입홍합추출오일복합물이 향후 다양한 만성 염증성 질환 치료제로 이용될 가능성은 충분하다고 사료된다(38). 또한 다른 연구 보고에서 관절염에 이환된 개와 말에서도 초록입홍합추출오일복합물을 먹였을 때 우수한 관절염 개선 효과를 보인다고 보고된 바 있으며, 향후 반려동물이나 가축의 관절염 치료에도 사용될 수 있다고 사료된다(39).

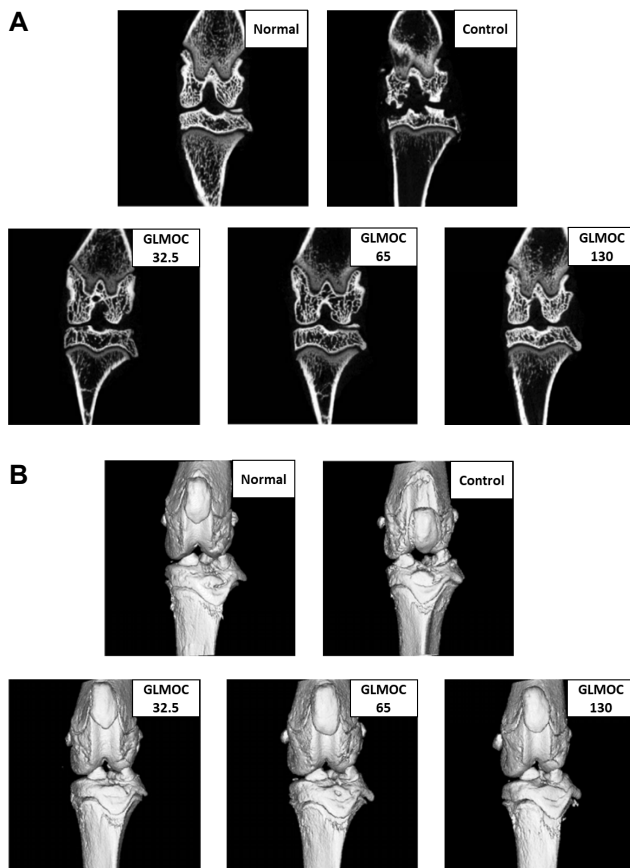


Fig. 5. Effects of green lipped mussel oil on imaging of cartilage degeneration using micro CT in joint of MIA-induced osteoarthritis animal model. Normal, injected and treated with saline; Control, MIA injected and treated with corn oil; GLMOC 32.5 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 32.5 mg/kg; GLMOC 65 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 65 mg/kg; GLMOC 130 mg/kg, MIA injected and treated with GLMOC 130 mg/kg.

요 약

골관절염은 관절을 보호하고 있는 연골의 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 생겨 염증과 통증이 발생하는 질환이다. 초록입홍합오일은 1970년

대 후반부터 관절염에 효능이 있다고 알려진 원료지만 연골 건강에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구는 초록입홍합오일을 포함하고 있는 관절팔팔이 퇴행성 관절염 동물 모델의 관절 및 연골에 미치는 영향과 이에 대한 작용기전을 확인하기 위해 수행되었다. 초록입홍합추출오일복합물은 LPS로 염증반응을 유도한 대식세포에서 iNOS, COX-2의 생성을 유의하게 감소시키고 IL-6, IL-1 β , TNF- α 등의 염증성 사이토카인의 분비를 억제하며, NF- κ B, MAPKs signaling을 조절한다고 보고되어 있다. 본 실험에서는 MIA로 골관절염을 유도한 수컷 흰쥐에서 염증을 유발하는 인자인 NF- κ B의 생성을 감소시켜 염증반응을 억제하였다. 그리고 연골을 분해하는 효소인 MMP-2, MMP-9 mRNA의 발현을 억제함으로써 관절 조직의 활막 과형성, 판누스 형성 및 연골 파괴를 모두 감소시켜 연골 손상을 감소시켰다. 대퇴골 및 경골의 해면골 면적 비율, 해면골 두께 및 해면골 수는 증가시키고 뼈 부식은 감소시켰다. 결론적으로 관절팔팔의 주원료인 초록입홍합추출오일복합물은 염증반응을 감소시키고 연골 파괴가 진행되는 것을 억제함으로써 관절 및 연골을 보호하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 (주)씨스팜의 지원으로 (주)바이오톡스텍에서 수행한 연구 결과의 일부로서 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Jung KH. 2017. Diagnosis and treatment of arthritis. *J Korean Neurol Assoc* 35(4 suppl): 25-30.
2. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. 2003. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-624.
3. Ministry of Health and Welfare. 2013. *Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2013*. Sejong, Korea. p 63.
4. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. 2012. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol* 83: 315-323.
5. Hielm-Björkman A, Tulamo RM, Salonen H, Raekallio M. 2009. Evaluating complementary therapies for canine osteoarthritis part I: Green-lipped mussel (*Perna canaliculus*). *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 365-373.
6. Stebbings S, Gray A, Schneiders AG, Sansom A. 2017. A randomized double-blind placebo-controlled trial to investigate the effectiveness and safety of a novel green-lipped mussel extract – BioLex® – for managing pain in moderate to severe osteoarthritis of the hip and knee. *BMC Complement Altern Med* 17: 416.
7. Jeon HS, Woo YK, Hwang SH, Suh SP, Lee JK. 2014. Pseudogout of the knee after intraarticular injection of hyaluronic acid. *J Korean Orthop Assoc* 49: 476-479.
8. Kim J, Kim JY, Kwak JS, Paek JE, Jeong S, Kwon O. 2014. Systematic review of the effect of glucosamine on joint health while focused on the evaluation of claims for health functional food. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 293-299.
9. National Evidence based Healthcare Collaborating Agency Research. 2010. National Evidence-based Healthcare Collaborating Agency Research Report. Seoul, Korea. 8: 1-384.
10. Miller MR, Pearce L, Bettjeman BI. 2014. Detailed distribution of lipids in Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*). *Nutrients* 6: 1454-1474.
11. Grienke U, Silke J, Tasdemir D. 2014. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chem* 142: 48-60.
12. Bierer TL, Bui LM. 2002. Improvement of arthritic signs in dogs fed green-lipped mussel (*Perna canaliculus*). *J Nutr* 132: 1634S-1636S.
13. Murphy KJ, Mann NJ, Sinclair AJ. 2003. Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. *Asia Pac J Clin Nutr* 12: 50-60.
14. Rainsford KD, Whitehouse MW. 1980. Gastroprotective and anti-inflammatory properties of green lipped mussel (*Perna canaliculus*) preparation. *Arzneimittelforschung* 30: 2128-2132.
15. Halpern GM. 2000. Anti-inflammatory effects of a stabilized lipid extract of *Perna canaliculus* (Lyprinol). *Allerg Immunol (Paris)* 32: 272-278.
16. Gibson RG, Gibson SL, Conway V, Chappell D. 1980. *Perna canaliculus* in the treatment of arthritis. *Practitioner* 224: 955-960.
17. Huskisson EC, Scott J, Bryans R. 1981. Seatone is ineffective in rheumatoid arthritis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 282: 1358-1359.
18. Cho SH, Jung YB, Sung SC, Park HB, Byeun KY, Lee DC, Song EK, Son JH. 2003. Clinical efficacy and safety of LYPRINOL®, a patented extract from New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) in patients with osteoarthritis of the hip and knee: multicenter clinical trial with a 2-month treatment period. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 35: 212-216.
19. Whitehouse MW, Macrides TA, Kalafatis N, Betts WH, Haynes DR, Broadbent J. 1997. Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (lyprinol) from the NZ green-lipped mussel. *Inflammopharmacology* 5: 237-246.
20. Roman-Blas JA, Jimenez SA. 2006. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 839-848.
21. Rigoglou S, Papavassiliou AG. 2013. The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2580-2584.
22. Chen J, Bao C, Cho SH, Lee HJ. 2017. Green lipped mussel oil complex suppresses lipopolysaccharide stimulated inflammation via regulating nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases signaling in RAW264.7 murine macrophages. *Food Sci Biotechnol* 26: 815-822.
23. Sellam J, Berenbaum F. 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6: 625-635.
24. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, Demiate IM. 2016. Collagen extraction process. *Int Food Res J* 23: 913-922.
25. Blair-Levy JM, Watts CE, Fiorentino NM, Dimitriadis EK, Marini JC, Lipsky PE. 2008. A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum* 58: 1096-1106.
26. Bakilan F, Armagan O, Ozgen M, Tascioglu F, Bolluk O,

- Alatas O. 2016. Effects of native type II collagen treatment on knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Eurasian J Med* 48: 95-101.
27. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. 2002. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169: 2643-2647.
28. Rose BJ, Kooyman DL. 2016. A tale of two joints: the role of matrix metalloproteases in cartilage biology. *Dis Markers* 2016: 4895050.
29. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 59: 455-461.
30. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. 2015. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet Mol Res* 14: 14811-14822.
31. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Fremont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S, Taiwo YO. 2001. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 751-760.
32. Kim EJ, Chung HW, Kim GY. 2008. Effect of *Achyranthes radix* and ultrasound in osteoarthritis rats articular cartilage. *Korean J Orient Physiol Pathol* 22: 390-395.
33. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR. 2008. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol* 26: 554-560.
34. Dieppe P. 2011. Developments in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 50: 245-247.
35. Lee JH, Chun KJ, Kim HS, Kim SH, Han P, Jun Y, Lim D. 2012. Alteration patterns of trabecular bone microarchitectural characteristics induced by osteoarthritis over time. *Clin Interv Aging* 7: 303-312.
36. Lee CH, Lum JH, Ng CK, McKay J, Butt YK, Wong MS, Lo SC. 2009. Pain controlling and cytokine-regulating effects of Lyprinol, a lipid extract of *Perna canaliculus*, in a rat adjuvant-induced arthritis model. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 239-245.
37. Lawson BR, Belkowski SM, Whitesides JF, Davis P, Lawson JW. 2007. Immunomodulation of murine collagen-induced arthritis by N,N-dimethylglycine and a preparation of *Perna canaliculus*. *BMC Complement Altern Med* 7: 20.
38. Song YW. 2009. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Korean J Med* 76: 1-6.
39. Pollard B, Guilford WG, Ankenbauer-Perkins KL, Hedderley D. 2006. Clinical efficacy and tolerance of an extract of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) in dogs presumptively diagnosed with degenerative joint disease. *N Z Vet J* 54: 114-118.