

# 乾薑附子湯이 papain으로 誘導된 骨關節炎 생쥐 모델에 미치는 影響

성영석<sup>1</sup> · 최학주<sup>1</sup> · 오정민<sup>1</sup> · 지중구<sup>2</sup> · 박지원<sup>1</sup> · 김동희<sup>1</sup> \*

## The Effect of KKBT in Papain-Induced Osteoarthritis Mice Models

Sung Yeong-Suk<sup>1</sup> · Choi Hak-Joo<sup>1</sup> · Oh Jeong-Min<sup>1</sup> · Ji Joong-Gu<sup>2</sup> · Bak Ji Won<sup>1</sup> · Kim Dong-Hee<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

<sup>2</sup>Dept. of Oriental health care, Joongbu University

To evaluate the efficacy of Keonkangbujatang (KKBT) in osteoarthritis treatments, C57BL/10 mice were treated with papain to induce osteoarthritis, and anti-arthritic effects were measured.

To ensure safety of the KKBT sample, ALT, AST, BUN, and creatinine levels were measured, and they were all within the normal range. Based on the fact that suppression of inflammatory cytokines leads to the improvement of arthritis, IL-1b, IL-6, TNF-a, and MCP-1 production levels were measured. The cytokines were significantly decreased in serum. Also, mRNA levels of IL-1b, IL-6, and iNOS-II were significantly decreased in joint tissues. PGE2, a usual inflammation vector, and LTB4, TXB2, that are involved in the onset and deterioration of inflammation, were all significantly decreased. The levels of white blood cells, neutrophils, and mononucleophiles also decreased, although the numbers were not significantly large.

Immune-modulation of KKBT in the pathological mechanism of cartilage deterioration by inflammatory cells and their vectors was proved. This study should provide basis for the development of effective therapeutics as well as use in clinical practice.

Key word : osteoarthritis, Keonkangbujatang (KKBT)

### I. 緒 論

골관절염은 사람의 노화현상에서 불가피한 질환으로, 아직 명확한 원인은 규명되어 있지 않으나 관절염의 일반적인 원인들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며 몇 가지 특이적인 원인들도 고려되고 있다<sup>1)</sup>. 흔히 노년층에서 골관절

염의 발병 빈도가 높은 것은 유년시절에 병태 생리적 과정에 장기간 노출되어 발생한 결과로 보고 있다<sup>2)</sup>. 골관절염의 첫번째 원인으로는 노화를 들 수 있는데, 나이가 들어감에 따라 관절 부위로 공급되는 혈류의 흐름이 감소하고 그와 더불어 골-연골 접합 부위에서 골개조(bone remodeling) 속도 또한 감소하기 때문이다. 노화와 더불어 말초신경의 기능이 저하되는데, 이 또한 골관절염의 소인을 증가시키는 요인으로 보고 있다<sup>3)</sup>. 아울러 물리적 손상이 생긴 후 완전히 회복되지 않았거나 염증성 관절질환의 후유증으로

\* 교신저자 : 김동희 대전대학교 병리학교실

E-mail : dhkim@dju.kr

투고일 : 2012년 7월11일 수정일 : 2012년 8월 8일

게재일 : 2012년 8월 8일

유발되는 경우도 있다. 골관절염의 다른 원인으로 비만이 있는데, 비만은 체중을 지탱하는 관절의 부하를 크게 증가시키고 자세와 보행에 변화를 일으키며, 이러한 상태가 지속되어 골관절염으로 진행되는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>.

골관절염은 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , L-6와 IL-1 $\beta$ 가 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되어 있다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 matrix metalloproteinase (MMPs)와 같은 단백질 분해효소의 합성을 직접적으로 유도하여 연골을 파괴 시킴으로써 관절의 기능이 소실되는 것으로 보고되고 있다<sup>5-8)</sup>.

골관절염의 약물 치료에는 아세트아미노펜, 비스테로이드성 항염제, 국소 도포용 진통크림, 하이알루론산 및 스테로이드제의 관절강 내 주사 등이 있다<sup>8)</sup>. 또한 최근에 대두되고 있는 골관절염 치료에는 골관절염 질병조정약제(disease modifying osteoarthritis drug, DMOAD)인 Tramadol과 COX-2 선택적 억제제인 celecoxib, refecoxib 등이 치료에 사용되고 있다<sup>9)</sup>. 그러나 다수의 대규모 임상 시험에서 부작용이 없으면서 골관절염의 진행을 완전히 차단하는 효과는 아직 한계가 있어, 효과적인 면역반응 억제 기전을 갖는 치료제의 개발에 대한 많은 투자가 이루어지고 있다<sup>9-11)</sup>. 특히 기존에 다양한 부작용으로 인하여 한약재, 천연물 등 생약으로부터 치료제를 개발하려고 하는 노력이 최근 활발하게 진행되고 있다<sup>12-14)</sup>.

본 시료인 乾薑附子湯은 傷寒論<sup>15)</sup>에 수제된 처방으로, 陽虛陰盛으로 나타나는 제 증상에 기본방으로 활용된다. 劉<sup>16)</sup>는 본 처방을 시료로 DPPH, NO, ROS 소거능, IL-1, 6, MCP 생성 억제능 등을 검색하여 산화적 스트레스와 염증에 의해 유발되는 만성 염증 관련 질환에 대하여 본 처방이 예방, 치료제로써 활용될 수 있음을 실험적으로 규명한 바가 있다. 또한 구성 약물인 乾薑과 附子, 그리고 이들 중심으로 이루어진 관련 처방의 鎮痛, 消炎 작용에 대한 연구도 수 차례 보고<sup>17-20)</sup>된 바가 있다. 특히 골관절염이 風寒濕의 기본 病因과 만성적인 경향 그리고 노인들에

게 호발한다는 점에서 溫中, 逐寒, 回陽, 止痛하는 효능을 지닌 한방처방과 약물은 골관절염에 대한 실험적 연구에 있어 유의성 있는 결과가 기대된다.

이에 본 연구에서는 20여종의 관절염 관련 처방의 in vitro 항염, 항관절염 검색을 통하여 유의성 있는 결과가 도출된 처방 중 건강부자탕(KKBT)의 주정 추출물을 시료로 동물 실험에 대한 효능을 평가하였다. 먼저 혈청을 분리하여 염증 사이토카인과 염증인자인 Prostaglandin E2, Leukotriene B4 등의 생성량을 측정하였다. 아울러 mCT-arthrography 분석으로 연골의 부피를 산출하여 관절의 염증 정도를 측정하였고, H&E 염색법과 safranin-O 염색법으로 조직에 침윤된 염증세포, 비정상적으로 증식한 활막세포, 뼈의 침식(erosion) 및 연골의 파괴 정도를 관찰한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 동물

암컷 6 주령의 C57BL/10 (22g)는 Harlan (San José, CA, USA)사에서 공급받았고, 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 정상군, 대조군, 양성대조군, KKBT투여군으로 하였으며 각각 6마리를 사용하였다 (동물실험승인번호: DJUAR2010-045).

#### 2) 약물

본 실험에 사용한 乾薑附子湯 (Keonkangbujatang 이하 KKBT로 지칭함)의 구성 약물은 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명과학연구원 (TBRC)에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 처방 50첩 분량인 75g 에 70% 주정 0.8L를 넣고 24시간 동안 침전하여 추출하고 감압농축기를

이용하여 분말화한 후 사용하였다.

Table 1. The Compositions of Keonkangbujatang (KKBT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
乾薑	<i>Zingiberis siccatum Rhizoma</i>	1
附子	<i>Aconiti Tuber</i>	0.5
Total		1.5

3) 시약

본 실험에 사용된 시약인 papain은 Sigma사 (USA) 제품을, (diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris- HCl, KCl, MgCl2, 적혈구 용혈액 (ACK lysis solution), DMEM 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, Sodium dodecyl sulfate (SDS), PMA, ionomycin, antibiotics는 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Thromboxane B2, iNOS-II, COX-2, MCP-1, Prostaglandin E2 그리고 Leukotriene B4 ELISA kit는 BioSource 사 (California, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator (Formascientific Co., USA), clean bench (Visionscientific Co., Korea), autoclave (Sanyo,Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Visionscientific Co., Korea), vortex mixer (Visionscientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer

(Sanyo, Japan), QuantitativeReal -Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ice-maker (Visionscientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), 및 ELISA leader (Molecular Devices, USA), micro-CT scanner (Skyscan, Belgium), 자동혈구측정기 (MS9-5, MELET SCHLOESING, France)등을 사용하였다.

2. 방법

1) Papain 투여에 의한 골관절염 유발

단백질 분해 물질인 papain을 무릎 관절강에 주입한 후 약물을 투여하여 약물투여에 의한 경시적 변화를 관찰하는 방법으로 평가하였다. Papain (type IV, double crystallized, 15 units/mg, Sigma, USA)은 농도가 1.0 % (w/v)가 되도록 조정하였고 (생리식염수) papain이 활성화되도록 0.03M L-cystein HCl (Sigma, USA)을 보충한 다음 슬개골 인대를 통과하여 우측 무릎 관절에 이용액 6  $\mu$ L를 투여하였다 (Papain 용액과 cysteine 용액을 1:1로 희석). Papain 용액은 투여 전 0.2  $\mu$ m syringe filter를 통과시켜 박테리아를 제거하였다. 실험은 정상군, 대조군, 양성대조군 (Joins<sup>®</sup>), KKBT 투여군으로 하였으며, 동물 수는 각 군당 6마리로 하였다.

2) 약물 투여

C57BL/10 생쥐에 papain을 주사한 후 일주일 (7일) 후부터 조인스정 (Joins<sup>®</sup>)과 KKBT를 각 400 mg/kg씩 매일 오전 11시에 총 4주간 투여하였다.

3) 염증 사이토카인 및 인자 ELISA 측정

실험 종료 후 혈액 및 synovial fluid를 채취하였다. 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 분리한 뒤, 염증성 지표인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 등의 사이토카인은 ELISA로 측정하고, Thromboxane B2, Prostaglandin E2, Leukotriene B4 등의 염증성 매개인자들은 각각

의 assay kit를 이용하여 농도를 측정하였다.

4) 혈액분석(Hematology)

최종 실험 종료 후 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 1.0 ml를 채혈하였다. 전혈을 바이오텍스텍(주)(청주, 충청북도)에 의뢰하여 백혈구 중 호중구, 단핵구의 총 세포수를 측정하였다. 혈구세포 수는 심장 천자법으로 채취한 혈액을 자동혈구 측정기 (MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

5) Quantitative real-time-PCR in knee joint

골관절염 유발 C57BL/10 생쥐의 무릎관절조직을 적출하여 각각에 RNAzolB 500 $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50 $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2  $\mu$ g을 DNase I (10U/ $\mu$ l) 2U/tube를 37 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 반응한 후 75 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5 $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides (25pmole/ 25 $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100 mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서

5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA)를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

Real time quantitative PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Mouse Olionucleotid의 염기배열은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
IL-1 $\beta$	Forward	5' CAACCAACAAGTGATAT TCTCCATG 3'
	Reverse	5' GATCCACACTCTCCAGC TGCA 3'
IL-6	Forward	5' TCCAGTTGCCTTCTTGG GAC 3'
	Reverse	5' GTGTAATTAAGCCTCCG ACTTG 3'
TNF- $\alpha$	Forward	5' TTCTGTCTACTGAACTT CGGGGTG ATCGGTCC 3'
	Reverse	5' GTATGAGATAGCAAAT CGGCTGA CGGTGTGGG 3'
COX-2	Forward	5' TCAAGTGGCATAGATG TGGAAAG AA 3'
	Reverse	5' TGGCTCTGCAGGATTTT CATG 3'
iNOS-II	Forward	5' GGCAGCCTGTGAGACCT TTG 3'
	Reverse	5' GCATTGGAAGTGAAGC GTTTC 3'

Cytokine 유전자 발현은 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS-II의 mRNA 발현은 대관절 조직을 분리하고 cDNA를 합성하여 분석하였다. PCR의 조건은

pre-denaturation은 50℃에서 2분, 94℃에서 10분 그리고 95℃에서 0.15분, 60℃에서 1분을 40회 수행하였다. Target group의 Quantitative PCR은  $y = x(1+e)^{-n}$  x = starting quantity y = yield n = number of cycles e = efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

3. 통계처리

대조군과 약물 투여군의 측정치를 비교하여 투여로 인한 변화를 대조군에 대한 투여군의 백분율로 표시하거나, 평균과 표준오차등 측정된 수치 및 오차를 근거로 t-test 방법으로 통계프로그램을 이용하여 유의성을 검증하였다.

III. 實驗 結果

1. 간 기능에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT는 정상군이  $30.9 \pm 2.6$  (U/L), 대조군이  $26.9 \pm 2.7$  (U/L)로 나타난 반면, 양성대조군인 Joins® 투여군에서는  $32.6 \pm 2.5$  (U/L), KKBT 투여군에서는  $65.9 \pm 31.7$  (IU/L)로 나타났다. AST는 정상군, 양성대조군, 대조군, KKBT 투여군에서 각각  $83.5 \pm 10.9$  (U/L),  $100.4 \pm 10.5$  (U/L),  $84.0 \pm 15.6$  (U/L),  $107.3 \pm 23.8$  (U/L)로 나타났다 (Fig. 1).

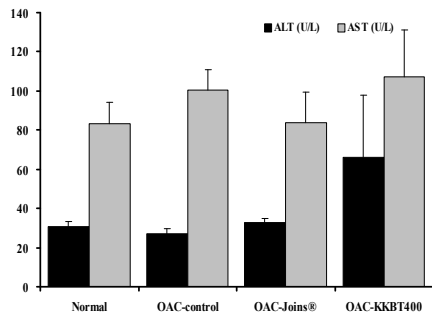


Fig. 1. Effect of KKBT on the ALT and AST in papaine-induced osteoarthritis mice. Normal ; C57BL/10 normal mice group OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis

group

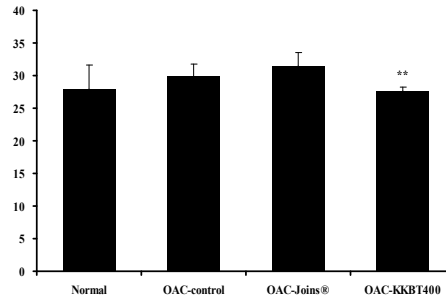
OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD.

2. 신 기능에 미치는 영향

혈청 중의 BUN 농도는 측정된 결과, 정상군이  $27.9 \pm 3.7$  mg/dl, 대조군이  $29.9 \pm 1.9$  mg/dl로 나타났으며, 양성대조군인 Joins® 투여군에서는  $31.4 \pm 2.2$  mg/dl, KKBT 투여군은  $27.6 \pm 0.6$  mg/dl로 나타나 KKBT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*P<0.01) 감소를 나타내었다 (Fig. 2a). 혈청 중의 creatinine 농도는 정상군은  $0.37 \pm 0.01$  mg/dl, 대조군은  $0.41 \pm 0.02$  mg/dl로 나타났으며, 양성대조군인 Joins® 투여군에서는  $0.41 \pm 0.02$  mg/dl, KKBT 투여군은  $0.37 \pm 0.01$  mg/dl로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*p<0.05) 감소를 나타냈다 (Fig. 2b).

2a



2b

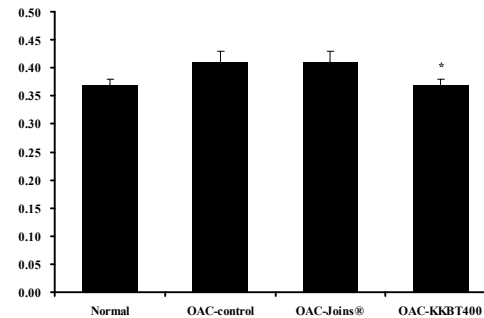


Fig. 2 Effect of KKBT on the BUN and creatinine in papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

3. 혈청 내 염증 사이토카인에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 IL-1β 생성량은 정상군이 6.9±2.1 pg/ml, 대조군이 139.3±23.0 pg/ml, 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이 15.6±3.6 pg/ml, KKBT 투여군이 53.3±6.7 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

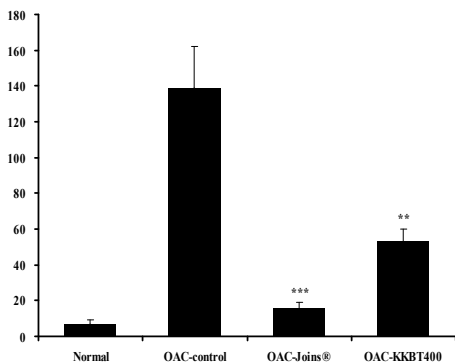


Fig. 3 Effects of KKBT on levels of IL-1β in the serum of papaine-induced osteoarthritis mice. The levels of IL-1β were determined using a Luminex system. Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 IL-6 생성량은 정상군이 58.4±15.0 pg/ml, 대조군이 1002.4±256.2 pg/ml, 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이 145.0±57.5 pg/ml, KKBT 투여군이 450.3±52.7 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01, \*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

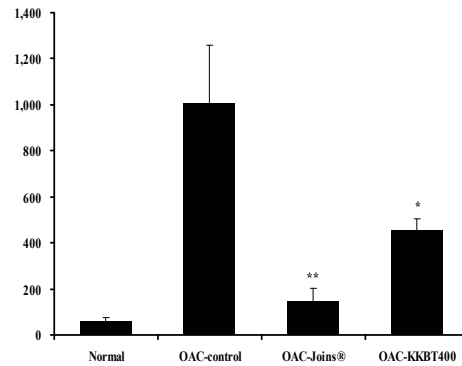


Fig. 4 Effects of KKBT on levels of IL-6 in the serum of papaine-induced osteoarthritis mice. The levels of IL-6 were determined using a Luminex system.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 MCP-1 생성량은 정상군이 2.5±0.4 pg/ml, 대조군이 122.4±15.2 pg/ml, 양성대조군인 Joins® 투여군이 33.4±11.0 pg/ml, KKBT 투여군이 64.5±18.5 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 각각 유의성 (\*\*p<0.001, \*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

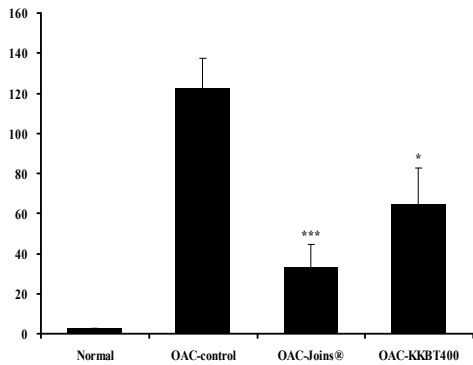


Fig. 5 Effects of KKBT on levels of MCP-1 in the serum of papaine-induced osteoarthritis mice. The levels of MCP-1 were determined using a Luminex system.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001).

4) TNF-α 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 TNF-α 생성량은 정상군이 10.6±1.9 pg/ml, 대조군이 142.4±19.1 pg/ml, 양성대조군인 Joins® 투여군이 38.4±8.0 pg/ml, KKBT 투여군이 78.1±12.4 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

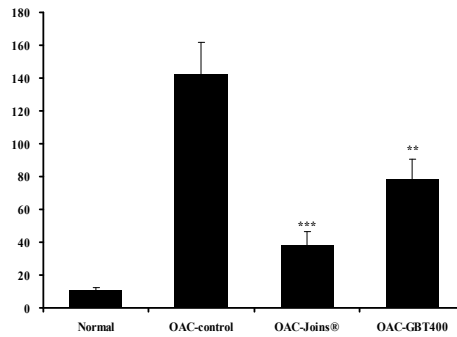


Fig. 6 Effects of KKBT on levels of TNF-α in the serum of papaine-induced mouse. The levels of TNF-α were determined using a Luminex system.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

4. 혈액 내 thromboxane B2에 미치는 영향

혈청 내의 thromboxane B2 생성량은 정상군이 17.3±4.1 pg/ml, 대조군이 49.2±14.2 pg/ml, 양성대조군인 Joins® 투여군이 14.2±1.8 pg/ml, KKBT 투여군이 32.1±5.8 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

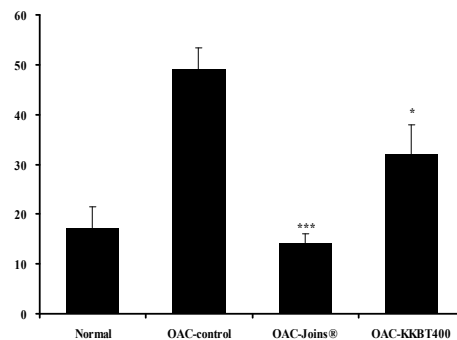


Fig. 7 Effects of KKBT on levels of thromboxane B2 in the serum of papaine-induced mouse.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001).

5. Leukotriene B4(LTB4) 생성에 미치는 영향  
 혈청 내의 Leukotriene B4 생성량은 정상군이 50.1±7.9 pg/ml, 대조군이 314.5±46.9 pg/ml, 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이 91.0±19.1 pg/ml, KKBT 투여군이 132.0±26.5 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비해 각각 유의성 (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

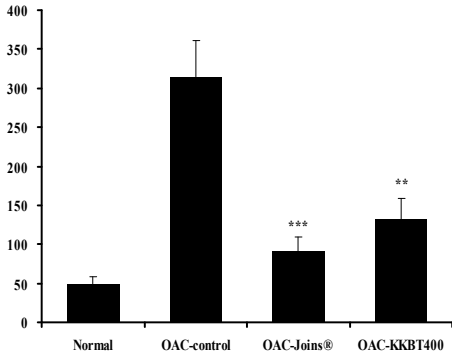


Fig. 8. Effects of KKBT on levels of Leukotriene B4 in the serum of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

6. Prostaglandin E2 생성에 미치는 영향  
 혈청 내의 Prostaglandin E2 생성량은 정상군이 59.2±0.7 pg/ml, 대조군이 271.0±20.8 pg/ml, 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이 123.2±42.4 pg/ml, KKBT 투여군이 108.6±25.6 pg/ml로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비해 각각 유의성 (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 9).

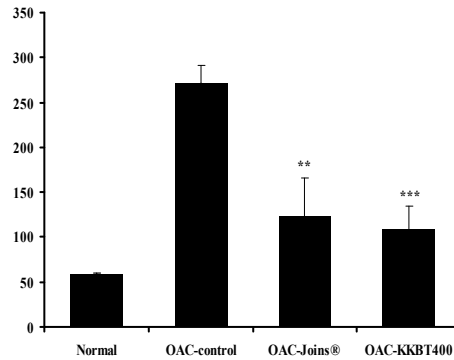


Fig. 9. Effects of KKBT on levels of Prostaglandin E2 in the serum of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

7. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향  
 1) 백혈구에 미치는 영향  
 혈액 내의 백혈구량은 정상군이 9.03±0.04 (x103/ml), 대조군이 8.43±0.49 (x103/ml), 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이 8.50±0.82 (x103/



mℓ), KKBT 투여군이  $8.06 \pm 0.73$  ( $\times 10^3/\text{m}\ell$ )로 나타났다 (Fig. 10).

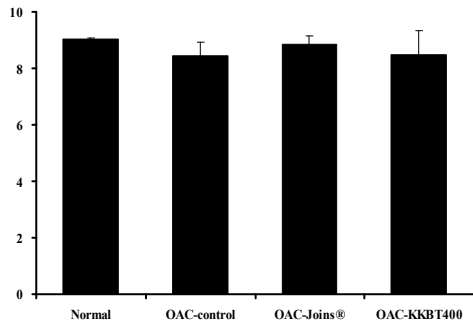


Fig. 10. Effects of KKBT on levels of white blood cells in the blood of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means  $\pm$  SD.

2) 중성구 (Neutrophils)에 미치는 영향

혈액 내 백혈구에 대한 중성구의 비율은 정상군이  $5.9 \pm 0.15$  (%), 대조군이  $22.1 \pm 4.12$  (%), 양성대조군인 Joins® 투여군이  $6.9 \pm 0.82$  (%), KKBT 투여군이  $16.8 \pm 0.92$  (%)로 나타나, 양성대조군은 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 감소를 나타내었으며, KKBT 투여군은 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 11).

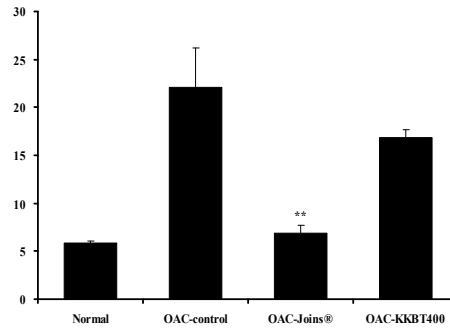


Fig. 11. Effects of KKBT on levels of neutrophils in the blood of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means  $\pm$  SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01).

3) 단핵구 (Monocyte)에 미치는 영향

혈액 내 백혈구에 대한 단핵구의 비율은 정상군이  $2.5 \pm 0.06$  (%), 대조군이  $5.6 \pm 1.10$  (%), 양성대조군인 Joins® 투여군이  $2.7 \pm 0.33$  (%), KKBT 투여군이  $5.5 \pm 0.15$  (%)로 나타나, 양성대조군은 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 감소를 나타내었고, KKBT 투여군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 12).

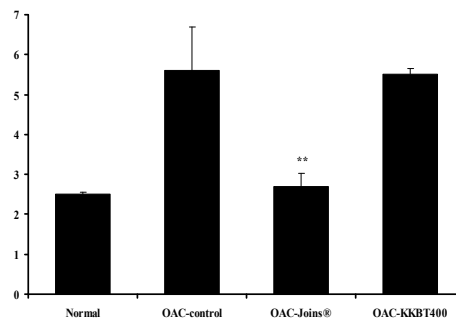


Fig. 12. Effects of KKBT on levels of monocyte in the blood of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01).

8. 염증 인자의 유전자 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA에 미치는 영향

슬관절 조직에서의 IL-1β의 mRNA 발현은 대조군의 유전자 발현을 1.07±0.07 (RQ)로 했을 때, 정상군이 0.21±0.03 (RQ), 양성대조군인 Joins® 투여군이 0.51±0.02 (RQ), KKBT 투여군이 0.36±0.13 (RQ)로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 13).

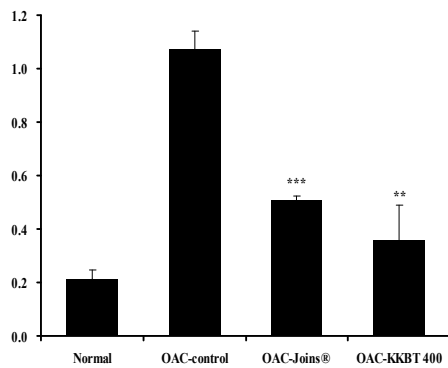


Fig. 13. Effects of KKBT on levels of IL-1β mRNA in the joint tissue of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD of 3 mice. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

2) IL-6 mRNA에 미치는 영향

슬관절 조직에서의 IL-6의 mRNA 발현은 대조군의 유전자 발현을 0.94±0.06 (RQ)로 했을 때, 정상군이 0.16±0.07 (RQ), 양성대조군인 Joins® 투여군이 0.36±0.06 (RQ), KKBT 투여군이 0.46±0.0 (RQ)로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 14).

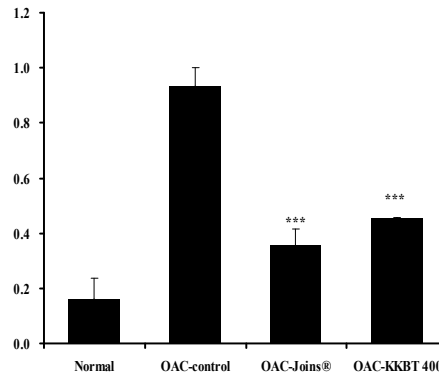


Fig. 14. Effects of KKBT on levels of IL-6 mRNA in the joint tissue of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*p<0.001).

3) TNF- $\alpha$  mRNA에 미치는 영향

슬관절 조직에서의 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현은 대조군의 유전자 발현을  $1.01 \pm 0.01$  (RQ)로 했을 때, 정상군이  $0.17 \pm 0.04$  (RQ), 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이  $0.58 \pm 0.01$  (RQ), KKBT 투여군이  $0.50 \pm 0.27$  (RQ)로 나타나, 양성대조군에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\* $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타냈고, KKBT 투여군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 15).

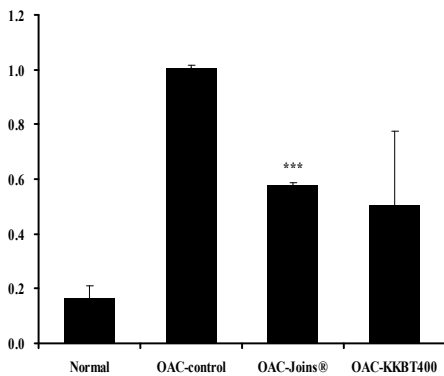


Fig. 15. Effects of KKBT on levels of TNF- $\alpha$  mRNA in the joint tissue of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means  $\pm$  SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\* $p < 0.001$ ).

4) COX-2 mRNA에 미치는 영향

슬관절 조직에서의 COX-2의 mRNA 발현은 대조군의 유전자 발현을  $1.13 \pm 0.13$  (RQ)로 했을 때, 정상군이  $0.06 \pm 0.03$  (RQ), 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이  $0.49 \pm 0.06$  (RQ), KKBT 투여군이  $0.75 \pm 0.15$  (RQ)로 나타나, 양성대조군에서

대조군에 비하여 유의성 (\*\* $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타냈고, KKBT 투여군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 16).

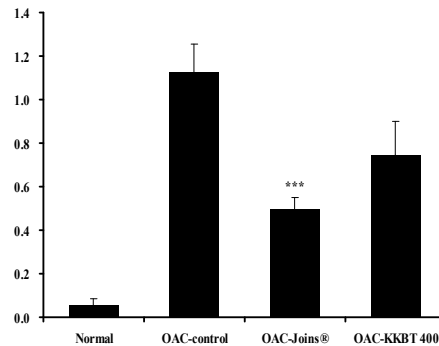


Fig. 16. Effects of KKBT on levels of COX-2 mRNA in the joint tissue of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group

OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group

OAC-Joins<sup>®</sup> ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins<sup>®</sup>

OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means  $\pm$  SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\* $p < 0.001$ ).

5) iNOS-II mRNA에 미치는 영향

슬관절 조직에서의 iNOS-II의 mRNA 발현은 대조군의 유전자 발현을  $1.09 \pm 0.09$  (RQ)로 했을 때, 정상군이  $0.25 \pm 0.09$  (RQ), 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군이  $0.51 \pm 0.10$  (RQ), KKBT 투여군이  $0.63 \pm 0.06$  (RQ)로 나타나, 양성대조군과 KKBT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\* $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 17).

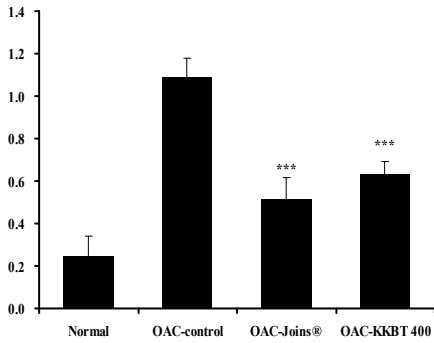


Fig. 17. Effects of KKBT on levels of iNOS-II mRNA in the joint tissue of papaine-induced osteoarthritis mice.

Normal ; C57BL/10 normal mice group  
 OAC-control ; Papain-induced osteoarthritis group  
 OAC-Joins® ; Papain-induced osteoarthritis group treated with Joins®  
 OAC-KKBT400 ; Papain-induced osteoarthritis group treated with KKBT400 Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by T test (\*\*\*)p<0.001).

#### IV. 考 察

퇴행성 관절염은 골관절염이라고도 하며, 국소적인 관절에 점진적으로 관절 연골의 소실 및 그와 관련된 이차적인 변화와 증상을 동반하는 질환이다. 관절을 보호하고 있는 연골의 점진적인 손상이나 퇴화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나서 염증과 통증이 생기는 질환으로, 관절의 염증성 질환 중 가장 높은 빈도를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>21-22)</sup>.

골관절염은 특별한 기질적 원인 없이 나이, 성별, 유전적 요소, 비만 등의 요인에 따라 특정 관절 부위에 발생하는 일차성 또는 특발성 관절염과 관절 연골에 손상을 줄 수 있는 외상, 질병 및 기형 등이 원인이 되어 발생하는 이차성 또는 속발성 관절염으로 분류한다<sup>23)</sup>.

최근 노령 인구의 증가에 따라 발병율이 증가 추세에 있으며, 60세 이후에는 여자의 25%, 남자의 15%에서 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 엉덩이 관절은 남성에게서 많이 나타나며, 손이나 무릎 관절은 여성에게서 더 많이 나타나며, 슬관절의 경우, 내측이 외측보다 10배 이상 더 흔히 침범되는 것으로 알려져 있다<sup>24-25)</sup>. 따라서 고령화가 급격히 진행되고 있는 상황에서 골관절염의 관리는 만성 장애 노인의 삶의 질을 유지하고 독립적인 생활을 영위하기 위한 주요한 관건의 하나라 할 수 있다. 현재까지의 골관절염 치료 목적은 관절의 구조적 손상을 회복시켜주는 치료의 방향이 아닌 증상 완화에 초점을 맞추어 통증을 줄이고, 질병의 진행을 지연시키며 관절기능과 삶의 질을 유지시키는데 있어 왔다. 그러나 최근에는 골관절염의 병인에 대해 심도 깊은 연구가 진행됨에 따라 병의 진행 자체를 차단하거나 지연시키고, 관절연골 손상을 회복시킬 수 있는 새로운 치료법들이 발표되고 있으며, 기존의 통증 위주의 치료법과 더불어 새로운 치료법들이 보고되고 있다<sup>26-28)</sup>. 골관절염의 약물 치료에는 아세트아미노펜, 비스테로이드성 항염제, 국소 도포용 진통크림, 하이알루론산의 관절강 내 주사, 스테로이드제의 관절강 내 주사 등이 있고, 최근 골관절염 치료에는 골관절염 질병조정약제(DMOAD)와 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물 등이 사용되고 있으며 현재 개발되고 있는 치료제로는 TGF-1 유전자를 이용한 치료제, 땃줄 혈액에서 분리한 간엽줄기세포를 이용한 치료제 등이 개발 단계에 있다. 그러나 임상 시험에서 부작용이 없고 골관절염의 진행을 완전히 차단하는 데는 아직 한계가 있어, 효과적인 면역반응 억제 기전을 갖는 치료제의 개발에 대한 관심이 높아 가고 있다. 특히 기존에 다양한 부작용으로 인하여 한약재, 천연물 등 생약으로부터 치료제를 개발하려고 하는 노력이 최근 활발하게 진행되고 있다<sup>12-14)</sup>.

본 실험에서는 김 등<sup>29)</sup>이 LPS 유도에 의해 염증이 유발된 생쥐의 혈중 염증 사이토카인의 변화에 대한 연구에서 염증에 효과가 있는 것으로

보고하고 있는 건강부자탕의 주정추출물을 단백질 분해 효소인 papain으로 유도한 골관절염 유발 생쥐에 투여하여 치료 효과를 검증하였다.

먼저 약물의 안전성을 확보하기 위하여 실시한 혈액 검사에서는 간기능 지표성분인 ALT와 AST 모두에서 정상 범위( $35 \pm 6.1$  U/L,  $85 \pm 10.8$  U/L)로 나타났으며 KKB T 투여군에서 대조군에 비하여 상대적으로 높게 나타났다(그림 1). 또한 신장 기능 지표성분인 BUN, creatinine을 측정 결과 역시 대조군과 비슷한 수치를 나타내었다(그림2a,2b).

최근 골관절염의 병인에 대한 연구가 진행되면서 골관절염은 관절의 분해활성이 증가됨으로써 연골의 구조적 손상과 기능소실이 발생하는 활성, 진행성 질병과정이란 인식이 보편화되고 있다. 연골세포는 활발하게 matrix를 합성하고 분해하며 호르몬이나 사이토카인에 의한 조절에 민감하게 반응한다. 세포외에 matrix 성장의 관여는 인슐린 증식 인자인 IGF-I이 합성을 자극하며, IGF-II는 태아의 성장에 중요한 역할을 한다<sup>30-31</sup>. 섬유아세포성장인자인 FGF는 세포분열에 관여하며 미숙한 연골 또는 성체에는 TGF- $\beta$ 가 관절합성에 관여한다. 그러나 대조적으로 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 IL-6, TNF- $\alpha$ 는 관절염증 즉 염증성 활막에 의해 다량으로 생산되어 matrix의 합성을 강하게 저해하고, 분해를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활막세포에서 생산된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 그리고 PGE2는 활막섬유아세포에 작용하여 RANKL의 발현을 유도하고 파골세포의 생성을 유도하여 골관절염을 일으키는 것으로 알려져있다<sup>32-33</sup>.

따라서 최근 염증성 사이토카인 각각에 대한 저해요법이 개발되어 오고 있는데, 생쥐 동물 모델을 통해 IL-1 $\beta$ 의 저해 작용이 관절염을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 보고되었으며<sup>34</sup>, TNF- $\alpha$ 의 중화요법은 임상에서 매우 유효성이 있는 것으로 증명되었다. Feldmann 등<sup>35</sup>에 의하면 사이토카인 저해요법이 관절염의 증상을 억제할 뿐만 아니라 관절 파괴의 진행 및 효과의 지속적인 유지에 효과적이라고 보고하고 있다. 따

라서 염증 사이토카인의 억제는 관절염의 치료와 귀결된다고 하겠다.

본 연구에서는 실험 종료 후 혈액 내의 IL-1 $\beta$  생성량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 양성대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군과 KKB T 투여군에서 유의성 있는(각각  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ) 감소 효과를 나타내었고(그림 3), IL-6 생성량 측정에서도 오직 papain만을 투여한 대조군에 비하여 양성 대조군인 Joins<sup>®</sup> 투여군과 KKB T 투여군에서 유의성 있는(각각  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(그림 4). TNF- $\alpha$  생성량 측정에서도 대조군에 비하여 Joins<sup>®</sup> 투여군과 KKB T 투여군에서 각각 유의성 있는(각각  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었으며(그림 6), MCP-1에서도 대조군에 비하여 각각 유의성 있는(각각  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(그림 5).

관절의 조직에서 사이토카인의 mRNA 발현 측정에서는 IL-1 $\beta$ 와 IL-6에서 Joins<sup>®</sup> 투여군과 KKB T 투여군에서 유사하게 유의성 있는(각각  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타냈으며(그림 13, 14), TNF- $\alpha$ 에서는 Joins<sup>®</sup> 투여군에서 유의성 있는( $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타냈고 KKB T 투여군에서는 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(그림 15). 염증성 사이토카인의 저해가 관절염의 억제에 효과적이라는 연구결과<sup>36-37</sup>를 근거로 볼 때 KKB T가 골관절염으로 인한 염증 병리 기전에 유의적으로 작용하는 것으로 판단된다.

Prostaglandins (PGs)는 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase (COX)의 반응에 의해 합성되는 생리활성 물질로 염증의 대표적인 매개체이다. 세포 외부에서 각종 자극에 반응해서 생체막의 인지질이 phospholipase A2(PLA2)에 의해 불포화지방산인 arachidonic acid으로 변환된다<sup>38-40</sup>. 이를 기질로 한 지방산산화효소인 COX의 작용에 의해 PGG2, PGH2로 변환되어 각종 세포에 국재되어 있는 특이적 합성효소에 의해 생리적으로 중요한 PGs와 Thromboxane A2가 합성된다. TXB2는 비가역적 혈소판 응집, 혈관이

나 기관지의 평활근 수축에 관여하는 TXA<sub>2</sub>의 대사산물이다<sup>40)</sup>.

Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)는 강력한 호중구, 마크로파지 유주 및 활성화 작용을 하는 arachidonic acid의 대사산물이다<sup>42-43)</sup>. LTB<sub>4</sub>는 세균 감염이나 이물질 제거 등 생체에 이로운 염증 반응과 함께 과도하게 생산되어 염증성 질환의 발증과 악화에 관여한다. 관절염의 병태 형성과 LTB<sub>4</sub>의 관련성은 다수 보고되어 있으며, 류머티스 관절염의 관절액 중에는 고농도의 LTB<sub>4</sub>가 검출되어 관절액 중의 백혈구수, 면역복합체의 농도 등과 상관 관계를 나타내는 인자로 알려져 있다<sup>44)</sup>. 류머티스 관절염 환자는 건강인 보다 LTB<sub>4</sub> 생산능이 높고 관절염 환자의 말초혈액 중의 단핵구 또는 활막 마크로파지는 호중구보다 LTB<sub>4</sub> 생산능력이 높은 것으로 알려져 있다<sup>45)</sup>. Griffiths RJ 등<sup>46)</sup>은 type II 콜라겐 유도 관절염 실험동물에서 LTB<sub>4</sub> 생산저해약을 투여하여 관절염이 억제 된 것으로 보고한 바가 있다. 본 연구에서는 TXB<sub>2</sub>의 혈청 내 생성량이 대조군에 비하여 양성대조군과 KKBT 투여군 모두 유의성 있는(\*\*p<0.001, \*p<0.05) 감소 효과를 나타냈으며 (그림 7), LTB<sub>4</sub> 역시 혈청 내 생성량을 확인한 결과 양성대조군과 KKBT 투여군에서 모두 유의성 있는 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 감소 효과를 나타냈다(그림 8). PGE<sub>2</sub>의 생성량에서도 KKBT가 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (그림 9).

관절염의 진행에는 여러 가지 면역 세포가 관여하여 마크로파지, 호중구, 중성구, 단핵구 등의 염증세포 침윤, 활막세포의 증식, 비만세포의 활성화 등 병태의 각 단계에 깊이 관여하며, 염증 부위에 침윤하는 하는 것으로 알려져 있다<sup>47-48)</sup>. 염증 부위에 침윤된 면역세포가 활성화하여 IL-1 $\beta$ , IL-6 그리고 TNF- $\alpha$  등의 염증성 사이토카인이 다량으로 생성되어 활막세포의 증식을 촉진시켜 관절의 염증 병태나 골, 연골의 파괴를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>49-51)</sup>.

본 연구에서는 혈액 내 백혈구의 수치는 정상군, 대조군, 양성대조군, KKBT 투여군 모두 차

이를 나타내지 않았으며 (그림 10), 중성구의 비율에서는 대조군에 비하여 양성대조군에서 유의성 있는(\*\*p<0.001) 차이를 보였고 KKBT 투여군에서는 감소하였으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다 (그림 11). 또한 혈액 내 단핵구의 비율은 중성구와 마찬가지로 대조군에 비하여 양성대조군에서는 유의성 있는(\*\*p<0.001) 감소를 나타내었으며 KKBT 투여군에서는 약간의 감소만이 관찰되었다 (그림 12). 결과적으로 전체적인 감소 효과는 관찰되었으나 유의성은 확인할 수 없었다.

COX-2는 IL-1이나 TNF- $\alpha$ 의 자극에 의해 일시적으로 세포핵 내에 생산되어 핵막에 존재하는 유도형 효소로, 염증세포인 마크로파지, 호중구, 섬유아세포 등에 발현한다. COX-2는 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 생산하고 혈관 투과성을 항진시켜 염증 초기의 혈관 삼출 반응에 관여하며<sup>52-54)</sup>, 만성관절염이나 변형성 관절염에 깊이 관여하여, COX-2 선택적 저해제가 관절염의 치료에 효과적임을 다수의 연구 결과를 통하여 보고되고 있다<sup>55)</sup>.

관절 조직에서의 COX-2 mRNA 발현 측정 결과 Joins<sup>®</sup> 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며, KKBT 투여군은 유의성은 없었으나 감소 효과를 나타내었다 (그림 16). 이 같은 결과는 본 실험에서 나타난 IL-1, TNF- $\alpha$  prostaglandin E<sub>2</sub> 등의 결과와 부합된다.

일산화질소(nitric oxide: NO)는 생체내의 각종 세포에서 생산되는 가스상 활성산소로 NO 생산효소(NOS)에 의해 생성된다. NOS는 신경형 nNOS와 내피형 eNOS 그리고 유도형 iNOS가 있다. iNOS는 각종 세포에 있어 감염이나 염증 등에 의해 유도된 IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  등의 매개체에 의해 전사레벨에서 유도되어 생산된 다량의 NO는 생체방어기구를 활성화하는 한편 세포장해를 일으킨다<sup>56-58)</sup>. iNOS의 지속적인 발현에 의해 NO가 과도하게 생산되면 패혈증이나 관절염 등 여러 가지 염증성 질환 또는 자가면역질환을 일으키며, 그 발병과 증상을 악화시키는데 깊이 관여하고 있다. 또한 류머티스 관절염이나 변

형성 관절염 환자의 활막세포 또는 연골세포에서는 iNOS mRNA나 단백질의 발현이 보고되고 있으며, 활막액 중에 NO의 농도가 상승하여 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있다<sup>59)</sup>.

본 연구 결과에서도 관절 조직에서 iNOS-II의 mRNA 발현은 양성대조군과 KGBT 투여군 모두에서 유의성 있는 (\*\*\*) $p < 0.001$ ) 결과가 나타났으며, 본 실험의 염증인자 결과와도 부합되는 결과가 도출되었다 (그림 17).

결과적으로 본 시료는 염증세포의 증식을 억제하여 염증세포 증식을 억제하여 염증세포와 그 매개체들에 의한 연골 파괴의 병리적 기전에 대하여 면역학적인 조절 작용으로 유의성 있는 효능을 나타냄으로써 객관적인 효능이 확인되었다. 향후 주정 추출과 열수 추출과의 차이점에 대한 부가적인 비교 실험을 통하여 보다 효과적인 치료제 개발에 대한 기초적 자료와 더불어 고서에서 제시된 동통 억제를 위한 주정 발효의 우수성에 대한 객관적 실험 결과가 도출되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

乾薑附子湯(KGBT)의 골관절염 치료 효능을 실험적으로 평가하고자, C57BL/ 10 생쥐에 papain으로 골관절염을 유도한 후 이를 투여하여 항관절염 효과를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KGBT는 혈액내 GOT, GPT, BUN, creatinine 수치를 모두 정상 범위로 유지하였다.
2. KGBT는 혈액 내 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 생성량을 대조군에 비하여 각각 61%, 55%, 45% 47.3%로 유의성 있게 감소시켰다.
3. KGBT는 혈액 내 prostaglandin E2, thromboxane B2 생성량을 대조군에 비하여 35%, 60%로 유의성 있게 감소시켰다.
4. KGBT는 혈액 내 leukotriene B4 생성량을 대조군에 비하여 58%로 유의성 있게 감소시켰다.

5. KGBT는 혈액 내 증성구, 단핵구의 비율을 대조군에 비하여 각각 24%, 2%로 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

6. KGBT는 관절 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS의 mRNA 발현을 대조군에 비하여 각각 52%, 51%, 42%로 유의성 있게 감소시켰고 TNF- $\alpha$ , COX-2 mRNA 발현을 대조군에 비하여 각각 24%, 33% 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

이상의 결과들을 보아 乾薑附子湯은 in vitro, in vivo 실험 모두에서 골관절염의 발증과 증상 악화를 유도하는 다양한 병리적 인자들에 대하여 억제효과를 나타냄으로써 실험적으로 객관적인 효능이 인정되었다. 한의학에서 중요시 여기는 한열에 대한 정확한 동물 병태 모델이 아니라는 점에서 골관절염에 일괄적으로 사용한다는 무리가 있으나, 변증시치를 통하여 본 방을 기본방으로 다양한 가감이 이루어진다면 만성적인 골관절염에 대한 임상 활용성이 제고될 수 있을 것으로 기대된다.

## 參 考 文 獻

1. Altman RD. The syndrome of osteoarthritis. J Rheumatol 24:766-7. 1997.
2. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 47:487-504. 1998.
3. Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. Ann Rheum Dis 53:406-20. 1994.
4. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al.: OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal

- of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 981-1000, 2007
5. Yuan PW, Liu DY, Chu XD, Hao YQ, Zhu C, Qu Q. Effects of preventive administration of juanbi capsules on TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 contents of joint fluid in the rabbit with knee osteoarthritis. *J Tradit Chin Med*. Dec;30(4):254-8, 2010.
  6. Smolen J, Kay J, Doyle MK et al. Golimumab, a new human anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, subcutaneously administered every 4 weeks in patients with active rheumatoid arthritis who were previously treated with anti-TNF- $\alpha$  agent(s): results of the randomized, double-blind, placebo-controlled, GO-AFTER study. *Ann Rheum Dis*;67(Suppl II):50.2008
  7. Takahashi K, et al : The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 182-190, 1999.
  8. Kintscher U, Goetze S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RA, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. *Eur J Pharmacol*, 401(3): 259-270, 2000.
  9. Qvist P, Bay-Jensen AC, Christiansen C, Dam EB, Pastoureau P, Karsdal MA. The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD): Is it in the horizon? *Pharmacol Res*. Jul;58(1):1-7. 2008.
  10. Strand V, Simon LS, Dougados M, Sands GH, Bhadra P, Breazna A, Immitt J. Treatment of osteoarthritis with continuous versus intermittent celecoxib. *J Rheumatol*. Dec;38(12):2625-34, 2011.
  11. Cameron M, Gagnier JJ, Little CV, Parsons TJ, Blümle A, Chrubasik S. Evidence of effectiveness of herbal medicinal products in the treatment of arthritis. Part I: Osteoarthritis. *Phytother Res*. Nov;23(11):1497-515, 2009.
  12. Wenz W, Breusch SJ, Graf J, Stratmann U. Ultrastructural findings after intraarticular application of hyaluronan in a canine model of arthropathy. *J Orthop Res* 18:604-12. 2002
  13. Zahmatkash M, Vafaenasab MR. Comparing analgesic effects of a topical herbal mixed medicine with salicylate in patients with knee osteoarthritis. *Pak J Biol Sci*. Jul 1;14(13):715-9, 2011.
  14. Lechner M, Steirer I, Brinkhaus B, Chen Y, Krist-Dungl C, Koschier A, Gantschacher M, Neumann K, Zauner-Dungl A. Efficacy of individualized Chinese herbal medication in osteoarthrosis of hip and knee: a double-blind, randomized-controlled clinical study. *J Altern Complement Med*. Jun;17(6):539-47, 2011.
  15. 채인식 : 상한론역전, 고문사, pp.334-335, 1991.
  16. 유길성 : 건강부자탕의 항산화 및 항염증 효능에 관한 연구, 대전대학교대학원, 2012.
  17. 박수현, 권용욱, 이태희 : 황련해독탕과 건



- 강부자탕이 LPS 유도에 의한 마우스 혈중 IL-6와 TNF- $\alpha$  변화에 미치는 영향, 대한한의학 방제학회지, 15(1):185-197, 2007.
18. 고동균, 윤정문, 이태희 : 부자가 LPS의 뇌실 주입으로 유발된 생쥐의 혈중 IL-6와 TNF- $\alpha$  변화에 미치는 영향, 대한한의학 방제학회지, 12(1):195-208, 2004.
  19. 이경무 외. 三氣飲이 흰쥐의 Monosodium Iodoacetate 유발 골관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 18(2):17-31. 2008.
  20. 박동수 외 : 봉독약침이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염 통증 모델에서 중추신경내 NOS, C-fos, Serotonin, Substance P 발현에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 17(3):1-18
  21. Altman RD, Tenenbaum J, Latta L, Riskin W, Blanco LN, Howell DS. Biomechanical and biochemical properties of dog cartilage in experimentally induced osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 43:83-90. 1984.
  22. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. *Nat Rev Rheumatol*. Jan;7(1):33-42. 2011.
  23. Park H, Lee SK. Association of obesity with osteoarthritis in elderly Korean women. *Maturitas*. Sep;70(1):65-8, 2011.
  24. Yang F, Shi Z. A study on papain-induced osteoarthritis in rabbit temporomandibular joint. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 20:330-2. 2002.
  25. Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:377-83. 2006.
  26. Hasegawa A, Otsuki S, Pauli C, Miyaki S, Patil S, Steklov N, Kinoshita M, Koziol J, D'Lima DD, Lotz MK. Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. Mar;64(3):696-704. 2012.
  27. Lotz MK, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol*. Aug 2;7(10):579-87, 2011.
  28. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. Sep;23(5):492-6, 2011.
  29. 김용문. 정수현, 김순중, 서일복 加味消炎湯이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향. 대한한의학 방제학회지 18(1) : 15-32, 2008
  30. 沢田哲司. 関節リウマチ-鑑別と治療選択のポイント. 診断と治療. 94 : 1155-1160. 2006.
  31. 佐野統. 関節リウマチの病態, 診断と最新治療. 兵医大医学会誌. 27 : 191-204. 2002.
  32. 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*, 58 : 754-763, 2008.
  33. Ji H, et al. : Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med*. 196 : 77-85, 2002.
  34. Hounoki H, Sugiyama E, Mohamed SG, Shinoda K, Taki H, Abdel-Aziz HO, Maruyama M, Kobayashi M, and Miyahara T. Activation of peroxisome

- proliferator-activated receptor $\gamma$  inhibits TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Bone* 42: 765-774, 2008.
35. Feldmann M, Maini SR. : Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 223 : 7-9, 2008
  36. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ and Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 191: 275-286. 2000.
  37. Hirohata S and Sakakibara J. Angiogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 353: 1331. 1999.
  38. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS and van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 43: 4-13. 2000.
  39. Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, Rosloniec EF, Morham SG, Shlopov BV, Goorha S and Ballou LR. The genetic ablation of cyclooxygenase-2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 2687-2693. 2000.
  40. Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D. Study of the role of leukotriene B<sub>4</sub> in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum.* Jul;46(7):1804-12. 2002.
  41. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 6(4):R355-65. 2004.
  42. Hashimoto A, Endo H, Hayashi I, Murakami Y, Kitasato H, Kono S, Matsui T, Tanaka S, Nishimura A, Urabe K, Itoman M, Kondo H. Differential expression of leukotriene B<sub>4</sub> receptor subtypes (BLT1 and BLT2) in human synovial tissues and synovial fluid leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* Aug;30(8):1712-8. 2003.
  43. Marcouiller P, Pelletier JP, Guévremont M, Martel-Pelletier J, Ranger P, Laufer S, Reboul P. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1 $\beta$  synthesis. *J Rheumatol.* Apr;32(4): 704-12 2005
  44. Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* Sep;15(5):623-739. 2003.
  45. Griffiths RJ, Pettipher ER, Farrell CA, Breslow R, Conklyn MJ, Smith MA, Hackman BC, Wimberly DJ, Milici AJ, Scampoli DN, Cheng JB, Pillar JS, Pazoles CJ, Doherty NS, Melvin LS, Reiter LA, Biggars MS, Falkner FC, Mitchell DY, Liston TE, Showell HJ:

- Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 517-521, 1995.
46. 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*, 185: 1123-1129, 1997.
47. Sasaki T, Irie-Sasaki JH, Jones RG et al. : Function of PI3K gamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *science* 287 : 1040-1046, 2000.
48. Del Prete A, Vermi W, Dander E, et al. : Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J* 23 : 3505-3515, 2004.
49. LaSargue M, Calvez R, Finan P, et al. : Phosphoinositide 3 kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 16 : 441-451, 2002.
50. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS and van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase -2 inhibitors. *Arthritis Rheum*. 2000; 43: 4-13.
51. Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, Rosloniec EF, Morham SG, Shlopov BV, Goorha S and Ballou LR. The genetic ablation of cyclooxygenase-2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 43: 2687-2693. 2000.
52. 石井宏知. ラット顎関節滑膜表層細胞の過剰開口負荷後におけるcyclooxygenase-2とHeat shock protein 25の発現の経時的変化. *鶴見歯学*. 30: 31-40. 2004.
53. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS and van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase -2 inhibitors. *Arthritis Rheum*. 43: 4-13. 2000.
54. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB: The role on nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*, 41: 1141-1151, 1998.
55. Salkowski CA, Detore G, McNally R, van Rooijen N, Vogel SN: Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN- $\gamma$ , and TNF receptor-1-mediated signaling. *J Immunol*, 158: 905-912, 1997.
56. Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. Jul-Aug;36(4):247-58, 2007.
57. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinnimonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY: Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med*, 184: 1519-1524, 1996.
58. Qiu B, Liu SQ, Peng H. Influence of sodium hyaluronate on iNOS expression in synovium and NO content in synovial fluid of rabbits with traumatic osteoarthritis. *Chin J Traumatol*. Oct;11(5):293-6. 2008.
59. Santangelo KS, Bertone AL. Effective reduction of the interleukin-1 $\beta$

transcript in osteoarthritis-prone guinea pig chondrocytes via short hairpin RNA mediated RNA interference influences gene expression of mediators implicated in disease pathogenesis. Osteoarthritis Cartilage. Dec;19(12): 1449-57, 2011.