



Original Article / 원저

마행의감탕(麻杏薏甘湯)이 골관절염 유발 흰쥐의 apoptosis 기전에 미치는 영향

김범회*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

The Protective Effects of *Mahaengeuigam-Tang* against Monosodium Iodoacetate induced Osteoarthritis in Rats

Bum Hoi Kim*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine and Research
Institute of Korean Medicine, Dong-eui University

ABSTRACT

Objectives : *Mahaengeuigam-Tang* (MHEGT) has been used as a traditional medicine for the treatment of rheumatic aarthritis, rheumatism, eczema and asthma. The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms of MHEGT for cartilage protection in monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritis, particularly focusing on apoptosis.

Method : Thirty young male Sprague-Dawley rats were used for the study. Rats were intra-articularly injected with 2 mg MIA in a total volume of 50 μ l saline. In MHEGT group, MHEGT extract was orally administered once daily to MIA-induced osteoarthritis rats, and rats of control group were given with saline only. At 4 weeks after MIA injection, all animals were sacrificed, and the histological changes and articular thickness were assessed by hematoxylin and eosin staining. Moreover, the immunohistochemical analyses of BAX and Bcl-2 were carried out.

Results : The histomorphological examinations revealed that MHEGT reduced MIA-induced cartilage damage. And, MHEGT ameliorated the severity of cartilage surface damages after MIA injection. Furthermore, MHEGT suppressed the MIA-induced increases of pro-apoptotic BAX protein and increased the protein expression of anti-apoptotic Bcl-2 protein.

Conclusion : These findings indicate that MHEGT protects against MIA-induced cartilage damage by inhibition of the apoptotic pathway, demonstrating significant protection of cartilage against osteoarthritis. These results suggest that MHEGT may potentially have clinical applications in the treatment of osteoarthritis.

Key words : Osteoarthritis, *Mahaengeuigam-Tang*, monosodium iodoacetate(MIA), BAX, Bcl-2.

I. 서론

골관절염(osteoarthritis)은 연골기능의 저하, 연골 세포의 감소, 연골하경화(subchondral sclerosis), 활액염(synovial inflammation) 등의 특징을 가진 퇴행성 관절질환이며, 연골세포(chondrocyte)에서의 특정 유전자의 발현은 관절연골의 생성과 퇴행을 유발하게 된다¹⁾. 슬관절염(knee osteoarthritis)은 노년층에서 흔히 발생하는 퇴행성 관절질환으로 임상적으로 진행성 슬관절 통증, 부종, 강직 및 관절 운동범위의 제한 및 심각한 경우 관절 기형으로 인해 관절의 기능 상실로 이어지며 환자의 삶의 질에 크게 영향을 미친다^{2,3)}. 골관절염의 발생원인에 대해서는 다양한 원인들이 제시되어 왔는데, 그 중에서 특히 apoptosis가 연골세포의 파괴에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다⁴⁾. Apoptosis는 인체의 발생과정, 항상성 유지 및 노화와 관련된 세포사멸인데, 골관절염의 발생 과정에서 연골 파괴의 정도와 기질(matrix)의 손실에 밀접히 관련되어 골관절염의 병리발생에 있어 주요인자로 여겨진다^{5,6)}.

마행의감탕(麻杏薏甘湯)은 『金匱要略』에 처음 기재된 처방으로 麻黃湯에서 桂枝를 제거하고 薏苡仁의 가한 것으로 發汗解表, 祛風利濕의 효능이 있어, 피부질환, 관절통, 신체통 등 風濕으로 인한 여러 질환에 사용되어 왔다⁷⁾. 麻杏薏甘湯에 대한 실험적 연구로는 흰쥐에서의 소염, 진통 및 해열작용과 급성 염증 및 만성 관절염, 부종억제 등에 대한 치료효과⁸⁾와 항산화과 항염증 활성에 대한 연구⁹⁾ 및 생쥐의 뇌와 위장관에서의 비만관련 인자에 미치는 영향¹⁰⁾ 등이 보고되었으며, 임상 연구로는 피부질환 개선효과¹¹⁾가 보고되었다. 이처럼 현재까지 麻杏薏甘湯에 대한 실험적, 임상적인 연구가 부족한 실정이며, 관절염의

치료와 발생기전에 있어서 麻杏薏甘湯이 미치는 영향에 대한 연구도 아직까지 많이 이루어지지 않았다. 특히 apoptosis 관련 단백질 변화에 대한 연구는 전무하다.

이에 본 연구는 흰쥐의 슬관절에 monosodium iodoacetate(MIA)을 주입하여 인위적인 관절염을 유발시키고 4주간 麻杏薏甘湯 물추출물을 경구투여 한 후, 슬관절 연골의 외형적 변화 및 해부조직학적 변화를 관찰하고 apoptosis 관련 BAX와 Bcl-2 단백질의 발현 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24℃, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: A2018-003).

2. 약물의 제조

본 연구에 사용된 麻杏薏甘湯은 (주)나눔제약에서 구입하였으며, 약물구성은 Table 1과 같다¹⁰⁾. 麻杏薏甘湯 5첩 분량인 240g을 증류수 2L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜

*Corresponding author : Bum Hoi Kim, Department of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7411, Fax : +82-51-850-7435, E-mail : bume@deu.ac.kr

• Received : October 24, 2018 / Revised : November 9, 2018 / Accepted : November 20, 2018



물추출액기스 58.2g을 얻었다. 투여량은 70kg 일반 성인의 하루 3첩 복용량으로 환산하여, 흰쥐 체중 100g당 50.0mg을 1ml 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

Table 1. Herbal Composition of *Mahaengeuigam-Tang*(MHEGT)

Herb name	Scientific name	weight(g)
麻黃	Ephedrae Herba	12
杏仁	Armeniacae amarum Semen	6
薏苡仁	Coicis Semen	24
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
Total amount		48

3. 슬관절염 유발

흰쥐의 슬관절염 유발은 Oh 등의 방법¹¹⁾에 따라 시행되었다. 요약하면, 흰쥐의 슬관절 연골손상은 실험동물을 diethyl ether로 마취시키고 Monosodium iodoacetate (MIA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.) 2mg을 멸균 생리식염수에 전체 용량이 50μl가 되도록하여 양쪽 슬관절강 내로 천천히 주입하였다. MIA 주입 후 실험동물에 무균 음수와 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, MIA를 주입한 날부터 4주 후 실험동물을 희생하여 변화를 관찰하였다.

4. 실험군의 분리와 약물 투여

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 normal, control, MHEGT 세 군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

Normal군에는 양쪽 슬관절강 내에 각각 주사용 생리식염수 50μl을 주사하고 4주간 1일 1회 증류수를 경구투여하였으며, control군은 양쪽 슬관절강 내에 각각 MIA 용액 50μl을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 4주간 1일 1회 증류수를 경구투여 하였다. MHEGT군은 슬관절 강 내에 각각 MIA 용액 50μl을 주사하고 4주간 매일 오전 일정한 시간에 麻杏薏甘湯 물추출물을 경구투여하였다.

5. 체중측정

실험기간동안 매일 오전 정해진 시간에 실험동물의 체중을 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 측정하였다.

6. 관절연골의 육안 관찰

고정된 우측 정강뼈 몸쪽 끝(proximal end)의 관

절연골 주변을 깨끗이 정리하고 사진 촬영하여 육안적으로 관절연골표면의 상태를 관찰하였다.

7. 해부조직학적 관찰

각 실험군 실험동물로 부터 채취한 정강뼈 몸쪽 끝부위 조직을 중성 formalin에 고정하고, 파라핀으로 고정하였다. 정강뼈 연골에 수직인 방향으로 8μm 두께의 조직 절편을 얻은 후 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 시행하여, 연골세포와 세포외기질(matrix)의 변성에 주안점을 두고 현미경 하에서 병리 조직학적 소견을 관찰하였다.

8. 관절연골의 두께 측정¹²⁾

각 실험군의 슬관절의 연골의 두께 변화를 측정하기 위하여 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 시행하고 촬영하여 영상분석을 통해 연골의 정중앙부의 두께를 측정하여 비교하였다. 연골의 두께는 골 피질선과 연골의 표면의 경계가 명확한 경우에 한하여 종단면에서 연골 표면에 수직이 되는 방향으로 측정하였다

9. 면역조직화학염색

관절염 발생에 있어서 apoptosis 기전에 대한 영향을 확인하기 위하여 BAX와 Bcl-2에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 염색방법은 자유부유법(free-floating)을 사용하였다. Primary antibody는 anti-BAX (ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Abcam), anti-Bcl-2 (sc-783, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz)로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다.

면역반응의 결과를 정량화하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정면적 내의 면역 양성반응 세포수를 측정하여 수치화하였다.

10. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, student's t-test를 사용하여 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였다.

III. 결과

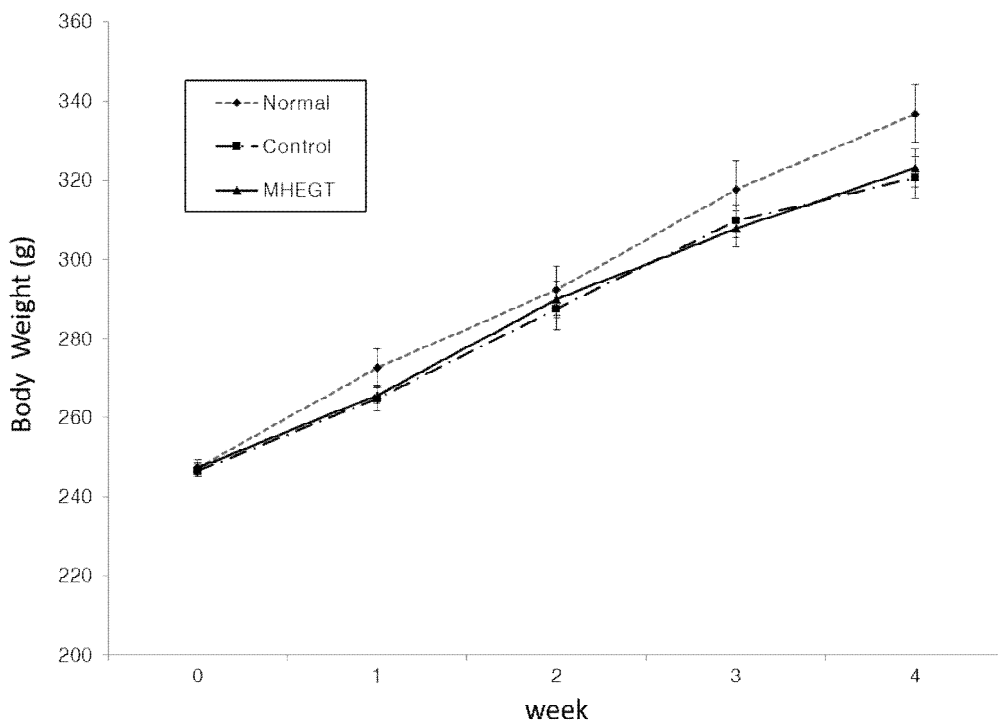


Fig. 1. Body weight changes of rats in normal, control, and MHEGT groups

There was no significant difference observed in the body weight among normal, control, and MHEGT groups.

2. 슬관절연골의 육안적 변화

각 실험군의 관절 연골을 육안으로 관찰한 결과, normal군의 경우 정강뼈(tibia)의 proximal end의 관절연골 표면은 윤기가 있고 매끈한 상태로, 연골표

1. 체중의 변화

4주간의 실험기간동안 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 체중이 점차 증가하는 양상이 나타났다. 실험 개시 당시 각 군별 흰쥐의 평균체중은 normal군, control군, MHEGT군에서 각각 $247.3 \pm 4.3g$, $246.6 \pm 5.5g$, $247.4 \pm 6.4g$ 이었으며, 4주후 마지막으로 측정된 체중은 normal군, control군, MHEGT군이 각각 $336.8 \pm 23.1g$, $320.7 \pm 16.4g$, $323.1 \pm 15.6g$ 으로 측정되어 MIA를 주입한 control군과 MHEGT군이 normal군에 비해 체중이 감소하였으나 유의성 있는 차이는 아니었다. 또한 control군과 MHEGT군의 비교에서는 MHEGT군이 control군에 비해 체중이 다소 증가하였으나 유의성 있는 변화는 아니었다(Fig. 2.).

면 소실이나, 골극형성(osteophyte formation) 등의 변화가 관찰되지 않았다. 반면에, MIA를 주입한 control군의 경우는 연골표면이 거칠게 변화되었으며 윤기가 감소하였다. 또한, 국소적으로 연골이 손상

혹은 불규칙한 형태로 파괴되고 부위에 따라서 작은 골극들이 관찰되었다. 麻杏薏甘湯을 경구투여한 MHEGT

군의 경우에도 연골표면의 변화가 관찰되었으나 control 군에 상대적으로 완화된 양상으로 확인되었다(Fig. 2.).

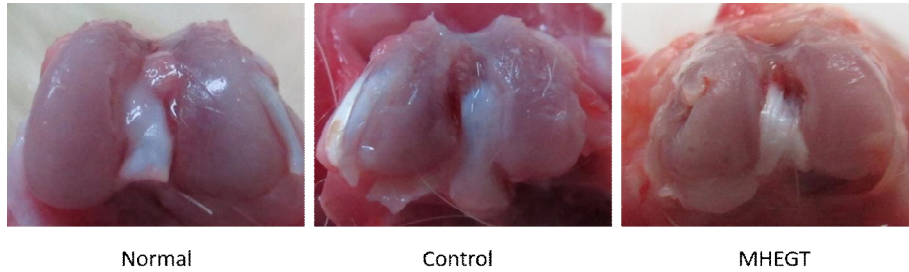


Fig. 2. Comparisons of gross appearance of right tibial plateau in rat of normal, control, and MHEGT groups.

Normal group showed no significant changes in the tibial plateau. In control group, the proximal condyle of the tibia showed rough joint surface and exhibited osteophyte formation. MHEGT group showed the recovered joint surface in comparison with control group.

3. 슬관절연골 절단면의 해부조직학적 변화

각 실험군의 무릎 관절 연골조직을 적출하여 H&E 염색을 시행하여 조직학적 변화를 관찰한 결과, normal군의 정상 연골조직과 연골세포의 모습을 나타내었다. 하지만 MIA를 무릎관절에 주입한 control

군의 경우는 국소적인 연골의 파괴로 인해 연골 부위의 두께가 normal군에 비해 감소되었다. 麻杏薏甘湯을 경구투여한 MHEGT군의 경우에는 관절연골의 변성이 관찰되었으나 control군에 비해 상대적으로 완화된 것으로 확인되었다(Fig. 3.).

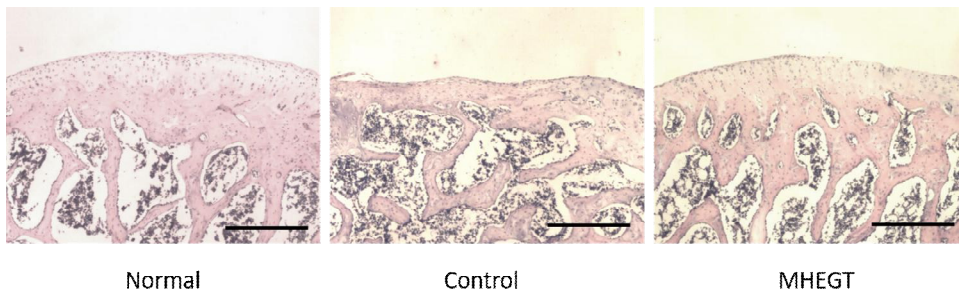


Fig. 3. The histological analyses of right articular cartilage and bone changes in the rat of normal, control, and MHEGT groups.

Normal group showed no significant changes. In control group, focal cartilage defect of articular surfaces were observed and subchondral bone volume and cartilage thickness were decreased. Whereas, MHEGT group showed recoveries in articular surface, subchondral bone volume, and cartilage thickness as compared with control group. Scale bar = 500µm

4. 슬관절연골의 두께 변화

무릎 관절의 연골 정중앙부를 촬영하여 영상분석을

통해 연골의 두께를 측정하여 비교한 결과, 연골의 평균 두께는 normal군은 $240.5 \pm 29.0 \mu\text{m}$, control군

은 $179.3 \pm 30.0 \mu\text{m}$ 로 측정되어 유의성 있는 감소를 나타내었다. 반면 麻杏薏甘湯을 경구투여한 MHEGT군

의 경우는 $211.0 \pm 27.2 \mu\text{m}$ 로 측정되어 평균 연골 두께의 유의성 있는 회복이 관찰되었다(Fig. 4.).

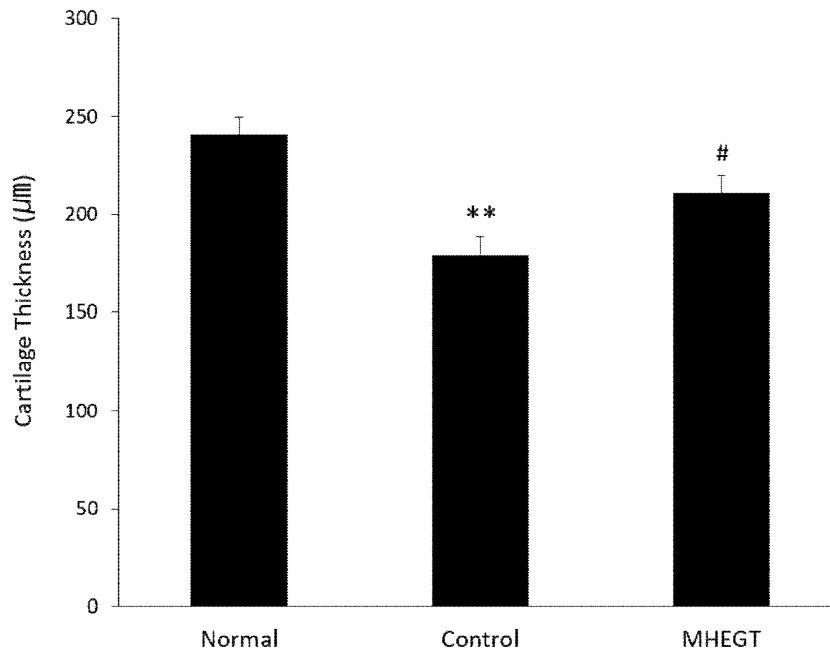


Fig. 4. Quantitative assessment of right articular cartilage thickness in the rat of normal, control, and MHEGT groups.

Control group significantly showed the decreased cartilage thickness in comparison with normal group. Whereas, the mean cartilage thickness of MHEGT group was recovered, as compared with control group.

** $P < 0.01$ compared with normal group

$P < 0.05$ compared with control group

5. 슬관절연골에서의 BAX, Bcl-2의 발현변화

슬관절에서 apoptosis 기전에 의한 골관절염 발생 기전에 있어서의 麻杏薏甘湯의 영향을 관찰하기 위하여 무릎관절 연골조직에서의 BAX와 Bcl-2 단백질 발현을 면역조직화학염색법을 시행하여 관찰하였다.

BAX의 경우, normal군에서 발현이 약하게 관찰된 반면, control군에서 뚜렷한 발현 상승이 관찰되었다. MHEGT에서도 발현이 상승하였으나, control군에 비해 상대적으로 발현이 줄어든 것으로 관찰되었다. 이러한 BAX의 발현 정도를 정량화하기 위해 양성반응 세포수를 측정하여 수치화한 결과에서도, normal군의 경우 평균 21.6 ± 9.6 인 반면, control군에서는

122.4 ± 25.3 로 급격히 상승하여 유의성 있는 증가를 나타내었다($P < 0.01$). MHEGT군의 경우에는 평균 90.9 ± 29.2 로 관찰되어 control군에서도 마찬가지로 유의성 있는 발현증가를 나타내었다($P < 0.01$). Control군과 MHEGT군을 비교한 결과에서는 MHEGT군이 control군에 비해 유의성 있는 발현감소가 관찰되었다.(Fig. 5., $P < 0.05$).

Bcl-2의 경우는 normal군에서는 BAX에서와 마찬가지로 발현이 약하게 관찰되었으나, control군에서는 뚜렷한 발현의 증가가 관찰되었다. MHEGT군에서는 Bcl-2의 발현이 더욱 증가하여 control군에 비해 더욱 뚜렷이 확인되었다. Bcl-2의 양성반응 세포수

를 측정하여 수치화한 결과에서는, normal군의 경우 평균 18.9 ± 10.7 , control군에서 95.6 ± 20.7 로 유의성 있는 증가를 나타내었다($P < 0.01$). MHEGT군의 경우에서도 116.5 ± 18.5 로 관찰되어 control군에서도 마찬가지로 normal군에 비교하여 유의성 있는 발현 증가를 나타내었다($P < 0.01$). Bcl-2 발현의 정도를 control군과 MHEGT군에서 비교한 결과에서는 MHEGT

군이 control군에 비해 발현이 더욱 증가되어 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 6., $P < 0.05$).

BAX/Bcl-2 ratio를 계산한 결과에서는 normal군에서 약 1.14, control군이 약 1.28로 측정된 반면, MHEGT군이 약 0.78로 측정되어 MHEGT군이 control군에 비해 감소되는 것으로 관찰되었다(Table 2.).

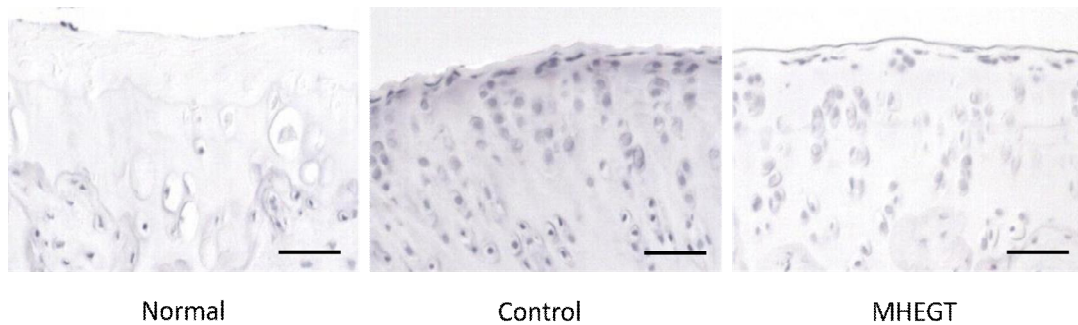


Fig. 5. Representative photographs of BAX immunoreactivities of right articular cartilage in Rats of normal, control, and MHEGT groups.

In control group, the immunoreactivities of BAX protein were significantly increased in comparison with normal group. However, the expressions of BAX in MHEGT group were decreased as compared with control group. Scale bar = $50 \mu\text{m}$

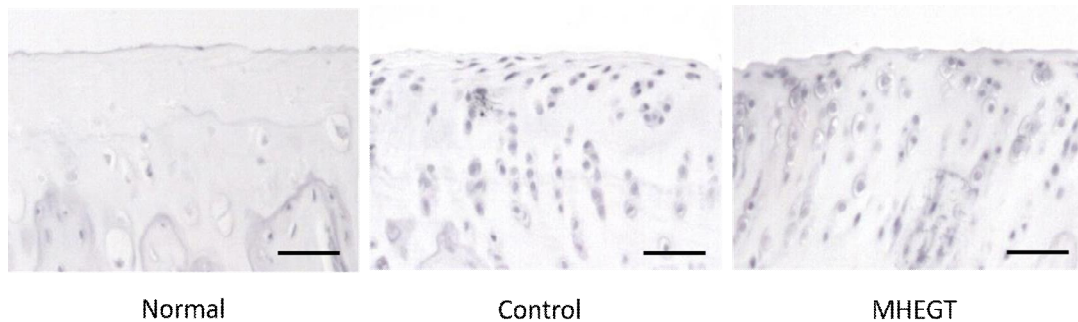


Fig. 6. Representative photographs of Bcl-2 immunoreactivities of articular cartilage in Rats of normal, control, and MHEGT groups.

In control group, the immunoreactivities of Bcl-2 protein were significantly increased in comparison with normal group. MHEGT group showed the more increased level of Bcl-2 as compared with control group. Scale bar = $50 \mu\text{m}$

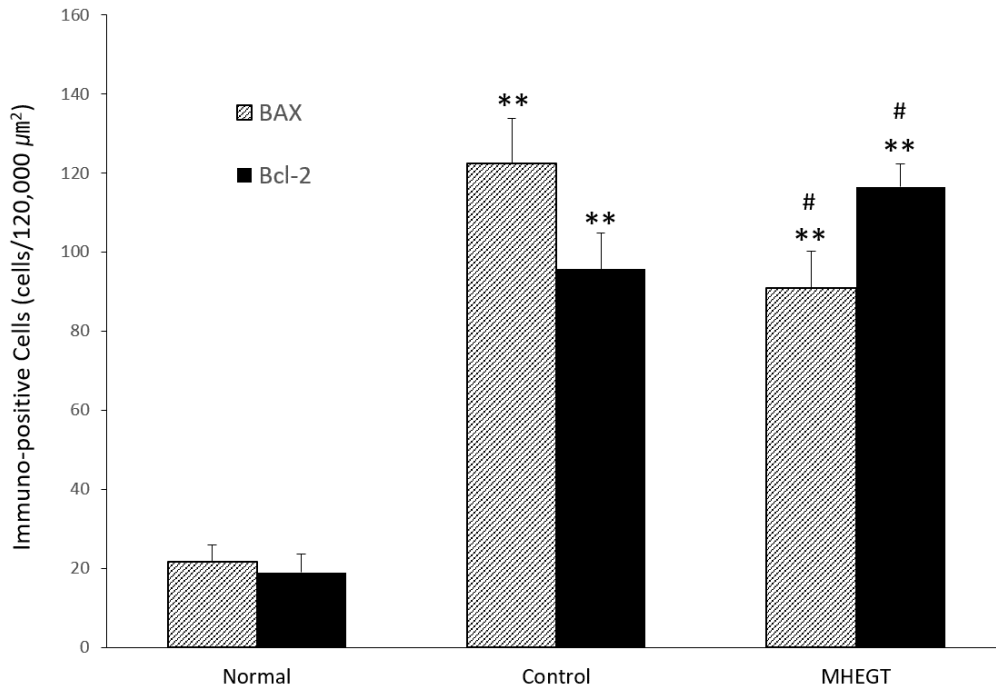


Fig. 6. Quantitative assessment of BAX and Bcl-2 immunohistochemistry in the rat of normal, control, and MHEGT groups.

The expression levels of apoptosis associated proteins BAX and Bcl-2 were increased in control group. MHEGT group showed down-regulated BAX expression in OA rat cartilage cells and up-regulated expression of Bcl-2

Table 2. BAX and Bcl-2 Immunohistochemistry of Normal, Control, and MHEGT groups.

Group	normal	control	MHEGT
BAX	21.6±9.6	122.4±25.3**	90.9±29.2**#
Bcl-2	18.9±10.7	95.6±20.7**	116.5±18.5**#
BAX/Bcl-2 ratio	1.14	1.28	0.78

** P<0.01 compared with right gastrocnemius

P<0.05 compared with control group

IV. 고찰

골관절염(Osteoarthritis: OA)은 주로 엉덩관절과 무릎관절 등과 같은 체중의 부하를 받는 부위에 자주 발생하며 운동장애를 유발하게 된다¹³⁾. 여러 위험 인자가 확인되었음에도 불구하고 골관절염의 정확한 병

인은 아직까지 명확하지 밝혀지지 않았다¹⁴⁾. 골관절염의 발생기전은 염증, 세포 사멸 및 대사 신호전달 사이의 다양한 상호 작용이 연골 세포에서 관여하기 때문에 상당히 복잡한 편이다¹⁵⁾. 염증을 줄이기 위한 예방적 혹은 대증적 요법들이 다양하게 사용되고 있지만 확실한 골관절염을 치료법은 아직 제시되지 못한 것이 사실이다. 관절연골의 퇴행은 골관절염의 주

요 관건이며, 연골감소는 연골하 경화(subchondral bone sclerosis) 및 활액막염증(synovial membrane inflammation)과 같은 관절에서의 구조적 대사적 변화와 관련이 있다¹⁶⁾. 연골 조직의 침식, 관절 연골에서의 골극 형성 및 연골 조직의 경화는 퇴행성 골관절염의 특징이다¹⁷⁾. 해당과정(glycolysis) 억제제인 monosodium iodoacetate (MIA)의 실험동물 슬관절 주입은 인체의 골관절염과 유사한 병리과정과 증상을 나타내기 때문에 골관절염 연구에 적합한 동물모델로 여겨지고 있으며 약물의 연골 보호작용을 평가하기 위해 주로 사용되고 있다¹⁸⁾. 이전 연구에 따르면 실험동물에 MIA 주입 후 관절에서의 염증성 변화는 7일 후부터 발생되며 28일째에 가장 심하게 나타나는 것으로 보고되었다^{11,19)}. 따라서 본 연구에서는 골관절염에서의 연골손상과 그 기전에 대한 麻杏薏甘湯의 보호효과를 검증하기 위하여 흰쥐의 양쪽 슬관절에 MIA를 주입하여 인위적인 골관절염을 유발하였고, 4주 후 실험동물을 희생하여 관절연골 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

우선, MIA 주입 4주 후 각 실험군의 흰쥐의 체중을 측정할 결과에서는 슬관절에 MIA를 주입한 control군과 MHEGT군에서 normal군에 비해 체중이 감소되는 결과를 보였다. 이는 MIA 주입 후 실험동물의 체중이 감소된다는 이전 연구들^{20,21)}과 일치하는 결과이며, control군과 MHEGT군 사이에는 유의성 있는 변화는 발견되지 않았다. 이는 麻杏薏甘湯 투여는 MIA로 인한 실험동물의 체중 감소의 회복에는 영향을 미치지 않음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

골관절염의 전형적인 병리학적 변화는 관절 연골의 악화 및 국소적 손실, 골극(osteophyte) 형성 및 관절 공간의 협착(narrowing)이다²²⁾. 관절에 MIA를 주입하게 되면 연골하골(subchondral bone)의 재구조의 과정에 따라 관절연골의 손상을 유발하는 것으로 밝혀졌는데²³⁾, 본 연구에서 흰쥐 슬관절에 MIA를 주입하고 28일 후 정강뼈(tibia)의 관절면을 육안으로 관찰한 결과 MIA를 주입한 control군의 경우는 연골 표면이 매끄러운 normal군에 비해 표면이 거칠게 변했으며 윤기가 감소하였다. 또한, 국소적인 연골 손상과 작은 골극들이 관찰되었다. 麻杏薏甘湯을 경구 투여한 MHEGT군에서는 이러한 변화가 control군에 상대적으로 회복된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 麻杏薏甘湯 투여가 MIA로 유발된 슬관절에서 의

형적인 관절연골 손상에 보호효과를 가지고 있음을 나타내는 것이 할 수 있다. 각 실험군 흰쥐의 슬관절 부위를 채취하여 정강뼈 몸쪽 연골 조직을 8 μ m 두께로 절편하여 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 통해 현미경 하에서 병리 조직학적 소견을 관찰한 결과에서는, MIA를 슬관절에 주입한 control군에서 국소적인 연골 파괴가 관찰되고 연골 부위의 두께가 normal군에 비해 감소되었다. 또한 부위에 따라 연골하 골조직의 형성이 관찰되었다. MIA 주입 후 4주간 麻杏薏甘湯을 경구투여한 MHEGT군에서도 유사한 관절연골의 변성이 관찰되었으나 control군에 비해 상대적으로 회복된 것으로 확인되었다. 현미경을 통해 확인 관절연골 두께의 회복을 실제 정량적으로 확인하기 위해 H&E 염색을 시행한 절편을 영상분석을 통해 연골의 정중앙부의 두께를 측정하여 비교한 결과에서는 control군의 슬관절 연골의 평균 두께는 normal군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 반면 麻杏薏甘湯을 경구투여한 MHEGT군에서는 control군에 비해 평균 연골 두께의 유의성 있는 회복이 관찰되었다. 이러한 결과를 통해 麻杏薏甘湯 투여는 MIA 주입으로 인한 관절연골 손상과 그에 따른 연골 두께의 감소에 유의한 보호효과가 있음을 알 수 있다.

연골세포 손상과 기질파괴는 상호간에 영향을 미쳐 서로를 악화시킬 수 있는데, 이전의 연구들에 따르면 골관절염에서의 관절연골 손상은 연골세포의 apoptosis와 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다^{4,5)}. 발생, 항상성 및 노화와 관련된 세포 사멸의 과정을 의미하는 apoptosis는 대개 두 가지 주요 경로, 즉 수용체 매개의 외부적 기전과 및 mitochondria 매개의 고유 경로를 통해 발생하는데, MIA에 의한 연골 세포의 apoptosis는 mitochondria에 의존적이며, ROS(reactive oxygen species)의 증가와 caspase의 활성화에 기인하는 것으로 알려졌다²⁴⁾. Apoptosis는 골관절염에서의 연골 세포의 손상과 기질파괴에 핵심적인 역할을 담당하며, 따라서 골관절염의 발병 기전의 주요 인자 중 하나로 여겨지고 있다. 즉 apoptosis에 의한 연골세포 파괴는 관절연골 손상을 유발하게 된다⁶⁾. 따라서 골관절염의 치료에 있어 연골세포의 증식을 유지하고 apoptosis를 억제하는 것이 중요하다고 할 수 있다. Bcl-2 family는 일반적으로 두 가지 종류의 단백질 군으로 구성되는데, 하나는 Bcl-2, Bcl-xL 및 Bcl-w를 포함하는 apoptosis 저해 단백질 군이고, 또 다른 부

류는 BAX, Bid 및 Bak를 포함하는 apoptosis 촉진 단백질 군이다. 이 중에서 특히 BAX와 Bcl-2가 세포 사멸 과정에서 중요한 역할을 하며, 이 두 가지 단백질의 발현 비율에 따라 apoptosis의 과정이 진행되는 것으로 알려졌다²⁵⁾. 즉, 관절연골에서 apoptosis 기전에 의해 BAX가 증가하면 상보적으로 Bcl-2도 동시에 증가되게 되는데, 이 BAX와 Bcl-2의 상대적인 비율에 따라서 골관절염의 촉진과 억제가 결정되게 된다. 이전 연구에 따르면 관절에 실험 동물에 MIA를 주입 후 관절연골 안에서 pro-apoptotic BAX의 활성이 증가하고 이에 상응하여 anti-apoptotic Bcl-2의 활성도 증가하는 것으로 보고되었다²⁶⁾. 본 연구에서는 슬관절에서 MIA 주입에 의한 apoptosis 기전에서 麻杏薏甘湯의 영향을 관찰하기 위하여 슬관절 연골조직에서의 BAX와 Bcl-2 단백질 발현변화를 면역조직화학염색법을 통해 관찰하였다. 그 결과, MIA를 주입 한 control군의 관절연골에서 normal군에 비하여 BAX의 활성이 증가하고 동시에 Bcl-2의 활성도 증가하였다. MIA 주입 후 麻杏薏甘湯을 경구 투여한 MHEGT군의 경우는 apoptosis를 촉진시키는 BAX 단백질 발현을 낮추었고 반대로 apoptosis을 억제 할 수 있는 Bcl-2 단백질 발현을 증가시켰다. 즉 마행의감탕은 골관절염의 apoptosis 기전에서 상대적으로 BAX의 활성을 억제시키고 Bcl-2를 촉진시키는 것으로 확인되었다.

다만, 본 연구에서는 골관절염의 발생에 있어 麻杏薏甘湯의 보호효과를 apoptosis 기전에 한하여 검증한 것으로, 추후 후속연구를 통해 그 외 다양한 골관절염의 발생기전에 있어서의 麻杏薏甘湯이 미치는 영향에 대해서도 연구가 이루어져야 할 것이다. 예를 들어, 이전 연구에서 흰쥐를 이용한 관절염 모델에서 麻杏薏甘湯의 소염, 진통, 해열 작용 및 부종 억제효과 등⁸⁾이 보고되었는데, 이와 관련하여 본 연구에서 확인된 麻杏薏甘湯의 apoptosis 기전의 억제효과 외에 이러한 소염 작용과의 상관성에 대해서도 연구할 필요성이 있다고 사료된다. 더불어 본 연구에서 미흡한 부분인 해부조직학적 변화에 대한 관찰도 다른 염색법 등을 사용하여 좀 더 깊이 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

본 연구는 MIA 주입으로 유도된 골관절염에서 麻

杏薏甘湯이 미치는 보호효과를 관찰한 것으로, 흰쥐 슬관절에 MIA 투여 후 麻杏薏甘湯 물추출물을 경구 투여하고 4주 후 체중변화, 정강뼈 근위단의 육안적 변화, 해부조직학적 변화 및 apoptosis 관련단백질 변화를 측정된 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

麻杏薏甘湯은 MIA로 유도된 슬관절의 골관절염에서 체중감소에 영향을 미치지 않았으나 정강뼈 관절면에서 연골손상과 기질과괴 및 연골두께 감소를 유의성 있게 억제시켰다. 또한, apoptosis 관련 단백질인 BAX와 Bcl-2의 발현변화를 관찰한 결과에서는 control군에 비해 BAX의 유의성 있는 감소와 Bcl-2의 유의성 있는 증가 및 BAX/Bcl-2 ratio의 감소를 나타냈다. 따라서, 골관절염에 대한 麻杏薏甘湯의 보호효과는 BAX의 발현 억제와 Bcl-2의 발현 촉진에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과로 麻杏薏甘湯은 슬관절염에 유의한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

References

1. Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14(5):578-84.
2. Tsujii A, Nakamura N, Horibe S. Age-related changes in the knee meniscus. *Knee.* 2017;24(6):1262-70.
3. Rodriguez-Merchan EC. Topical therapies for knee osteoarthritis. *Postgrad Med.* 2018;130(7):607-12.
4. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41(2):284-9.
5. Kim DY, Taylor HW, Moore RM, Paulsen DB, Cho DY. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *Vet J.* 2003;166(1):52-7.
6. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(1):27-34.



7. Lee SI, Kim DG, Kim YP, Roh SH, Park YJ, Joo YS. Herbal Formula Science. 2nd ed. Seoul:Young Lim Sa. 1994:47.
8. Moon YH, Roh EM. Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Actions of Mahaengeuigam-Tang. Korean Journal of Pharmacognosy. 2001;32(3): 242-7.
9. Lee SG, Lee EJ, Park WD, KIm JB, Choi SW. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from Korean Traditional Medicinal Prescriptions. Korean Journal of Food Science and Technology. 2011;43(5): 624-32.
10. Kim TH, Lee CH. Effects of Mahangeuigam-Tang on Obesity-related Factors in Brain and Gastrointestinal Tract of Mice. Journal of physiology & pathology in Korean Medicine. 2012;26(2):166-74.
11. Hong JM, Shin JK, Kim JY, Jang MJ, Park SK, Lee JH, Choi JH, Lee SM. BST106 Protects against Cartilage Damage by Inhibition of Apoptosis and Enhancement of Autophagy in Osteoarthritic Rats. Biol Pharm Bull. 2018; 41(8):1257-68.
12. Oh IS, Kim MK, Lee SH, Park SW, Kwon DG. The Change of Articular Cartilage Thickness of the Knee Joint Related to Age in Korean. Knee surgery & related research. 2005;17(1):1-7.
13. Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. J Pain Res. 2018;11: 2189-96.
14. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. Osteoarthritis Cartilage. 2015; 23(4):507-15.
15. Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. Acta Med Port. 2015;28(1):99-106.
16. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2012; 8(11):665-73.
17. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. Curr Opin Rheumatol. 1998;10(3):256-62.
18. Morais SV, Czczko NG, Malafaia O, Ribas JM Filho, Garcia JB, Miguel MT, Zini C, Massignan AG. Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. Acta Cir Bras. 2016;31(11): 765-73.
19. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Monoiodoacetate induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. Toxicol Pathol. 2003;31(6):619-24.
20. Marker CL, Pomonis JD. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. Methods Mol Biol. 2012;851:239-48.
21. Wang ZM, Chen YC, Wang DP. Resveratrol, a natural antioxidant, protects monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. Biomed Pharmacother. 2016;83:763-70.
22. Junker S, Krumbholz G, Frommer KW, Rehart S, Steinmeyer J, Rickert M, Schett G, Müller-Ladner U, Neumann E. Differentiation of osteophyte types in osteoarthritis - proposal of a histological classification. Joint Bone Spine. 2016;83(1):63-7.
23. Takahashi I, Matsuzaki T, Hosono M. Long-term histopathological developments in knee-joint components in a rat model of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. J Phys Ther Sci. 2017;29(4):590-7.
24. Jiang L, Li L, Geng C, Gong D, Jiang L, Ishikawa N, Kajima K, Zhong L. Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes in vitro. J Orthop Res. 2013;31(3):364-9.

25. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(8):1243-6.
26. Zhnag HD. Protective effect of diacerein on MIA-induced injury in rat osteoarthritis chondrocytes. *Chongqing Medicine*. 2016;45(8):1019-1021.