

## 氣血疏通丸이 Monosodium iodoacetate로 骨關節炎을 誘導한 랫드에 미치는 影響

허문강<sup>1#</sup>, 김순근<sup>1</sup>, 최학주<sup>2</sup>, 김동희<sup>1,3\*</sup>

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 건강나라 자연의학 연구소  
3 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터

### Effects of giheolsotong-hwan on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats

Wen-Qiang Xu<sup>1#</sup>, Soon-Keun Kim<sup>2</sup>, Hak-Joo Choi<sup>3</sup>, Dong-Hee Kim<sup>1,3\*</sup>

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University  
2 : Health country and Natural medicine laboratory  
3 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC-RIC), Daejeon University

#### ABSTRACT

**Objectives** : In cases of osteoarthritis, the hypofunction of the cartilage and joint leads to a limited range of joint motion, swelling, and pain, which is generally treated using pharmaceutical drugs (e.g., anti-inflammatory agents, cartilage protectants, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs) or replacement arthroplasty. However, long-term drug treatment is associated with adverse effects on the gastrointestinal systems. The present study aimed to evaluate the ability of Giheolsotong-hwan to treat of osteoarthritis symptoms in the MIA-induced rat model based on histological analysis, and factors that are associated with inflammation and bone mineral metabolism.

**Methods** : Giheolsotong-hwan was administered orally at doses of 200 mg/kg/day or 400 mg/kg/day for 2 weeks before direct injection of monosodium iodoacetate (3 mg/50 $\mu$ l of 0.9% saline) into the intra-articular space of the rats' right knee. The rats subsequently received the same doses of oral Giheolsotong-hwan for another 4 weeks. We evaluated the treatment effects based on serum biomarkers and histopathological analysis of the knee joints.

**Results** : Compared to those in control rats, the Giheolsotong-hwan treatments significantly decreased the serum concentration of inflammation factors (i.e., IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub>), and bone degrade factors (i.e., MMP-9, CTX-II, and COMP). In addition, the Giheolsotong-hwan treatments significantly increased the concentration of glycosaminoglycans of bone defence factors, but no change the TIMP-1. Furthermore, the Giheolsotong-hwan treatments effectively preserved the knee cartilage and proteoglycan.

**Conclusion** : The results indicate that Giheolsotong-hwan treated osteoarthritis symptoms. Thus, Giheolsotong-hwan may be a novel oriental therapeutic option for the management of osteoarthritis.

**Key words** : bone metabolism, Giheolsotong-hwan, inflammation factors, oriental therapeutic, osteoarthritis

\*Corresponding author : Dong-Hee Kim, Daejeon University, Korea.  
· Tel : +82-42-280-2636 · E-mail : dhkim@dju.ac.kr

#First author : Wen-Qiang Xu, Daejeon University, Korea.

· Tel : +82-42-280-2827 · E-mail : moonkang924@naver.com

· Received : 17 April 2018 · Revised : 9 May 2018 · Accepted : 25 May 2018

## I. 서론

골관절염 (Osteoarthritis)은 '퇴행성관절염'이라고 지칭되며, 중년 또는 노년기에 흔히 발생하는 임상적 질환으로 관절 연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연부의 과잉 골형성 및 관절의 변형에 따른 반복적인 동통, 관절 강직감과 점진적인 운동장애 등을 초래한다<sup>1,2)</sup>.

건강보험심사평가원 자료<sup>3)</sup>에 의하면 골관절염은 50대 이상의 중노년층에서 91% 이상의 유병률을 차지하고 있으며, 2015년 약 449만 명에서 2016년 약 463만 명으로 여전히 증가 추세이다.

현재 골관절염의 치료는 통증과 염증을 완화시키는 NSAIDs (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs), 코르티코스테로이드 호르몬 (corticosteroid hormone, 코데인 (codeine), 옥시코돈 (oxycodone) 등의 약물 요법과 더불어 동통 제거, 기능회복, 연골파손 억제를 위한 유리체의 제거, 관절 치환술, 활막 절제술, 관절 유합술 등의 수술요법이 활용되고 있다<sup>4)</sup>.

평균 수명의 증가로 의료계 해결 과제로 인식되고 있는 골관절염 치료를 위해 다양한 약물과 수술방법 등이 상기한 바와 같이 사용되어 유의적인 성과를 거두고 있지만, 수술요법은 인체에 대한 손상이 크고 재수술과 같은 문제점이 초래되고 있으며, 약물은 장기간 복용할 경우 위장 장애 등 다양한 부작용이 보고되고 있는 실정이다<sup>5)</sup>.

한의학에서 골관절염은 '痺證' 범위에 속하며 발병 초기에는 風寒濕邪 침입으로 體虛邪實 또는 虛實夾雜의 병기가 발생하고, 점진적으로 熱, 痰 및 瘀血 등의 복잡한 병리적 변화가 나타남으로써 만성적이고 고질적인 증상을 유발한다<sup>6)</sup>.

이에 대한 치료법으로는 辨證論治에 준하여 祛風濕, 補肝腎, 強筋骨, 清熱化痰, 活血祛瘀 등의 방법이 사용되고 있으며, 침, 약침, 국부 마사지, 운동요법 등이 병용되고 있다<sup>1,7)</sup>.

Monosodium iodoacetate (MIA)으로 골관절염을 유도한 동물모델은 연골의 손상과 기능 장애, 통증 등의 증상이 실제 골관절염 질환과 유사하여 골관절염의 효능 평가에 활발히 이용되고 있는데, 桂枝附子湯<sup>8)</sup>, 健步丹<sup>9)</sup>, 附子瀉心湯<sup>10)</sup>, 麻黃附子細辛湯<sup>11)</sup>, 疎風活血湯<sup>12)</sup> 등이 본 병태 모델을 통하여 유의성이 증명된 바가 있다.

본 실험에 사용한 기혈소통환(氣血疏通丸)의 구성 약재는 祛風解表, 勝濕止痛 등에 대한 효능을 가진 羌活, 防風, 獨活, 秦艽 등과 散寒止痛, 補血行氣 등에 효능을 갖는 當歸, 白芷, 杜仲, 白芍藥, 薑黃, 散熱燥濕 효능의 蔓荊子, 仙茅, 甘菊, 薄荷, 黃柏 등과 化痰消腫 효능의 白芥子로 구성되어 현재 관절염에 대한 임상방이다<sup>13,14)</sup>.

이에 본 연구는 현재 임상에서 활용하는 氣血疏通丸이 골관절염 질환에 대한 객관적인 효능을 실험적으로 규명하여 EBM (Evidence-Based Medicine)을 구축하고자, MIA 골관절염 병태 모델 제작 2주 전부터 경구 투여하고 병태 모델 제작 후 4주간 총 6주를 경구 투여한 결과, 혈액 바이오마커 및 조직병리학적 검사 등을 통해 관절염 유관 인자와 형태학적 관찰에 있어 유의성 있는 결과가 도출되었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 약재

본 실험에 사용한 氣血疏通丸(이하, GSH)의 구성 약재들은 (주)옵니허브에서 防風, 蔓荊子, 仙茅, 秦艽, 黃柏, 芥子, 甘草는 중국산, 薑黃은 미얀마산이었으며, 나머지 약재는 국산으로 구매하였다. 구매한 약재는 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용하였고, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of GSH

Herbal medicine name	Abbreviation	Weight (g)
羌活	Osterici Radix	3
防風	Saposhnikoviae Radix	3
當歸	Angelicae Gigantis Radix	3
蔓荊子	Vitex negundo L.	3
香附子	Cyperi Rhizoma	2
黃芪	Astragali Radix	2
白芷	Angelicae dahuricae Radix	2
甘菊	Chrysanthemi Flos	2
薄荷	Mentha haplocalyx Briq.	2
仙茅	Curculigo orchioides Gaertn.	2
獨活	Angelicae Pubescentis Radix	2
杜仲	Eucommiae Cortex	2
秦艽	Gentianae Macrophyllae Radix	2
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	2
薑黃	Curcumae longae Rhizoma	2
黃柏	Phellodendron chinese Schneid.	2
芥子	Sinapis Semen	1
甘草	Glycyrrhizae Radix	1
Total amount		38

### 2. 동물 및 사료

실험동물인 수컷 7주령의 SD-Rat (200~220 g)는 (주)셈타코BIOKOREA (Korea)에서 공급받아 실험 당일까지 일반 고형사료 (2018S, ENVIGO Co., U.K)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인 (동물사용 윤리위원회 승인 번호-DJUARB 2017-020)을 받아 동물 윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

### 3. 시약 및 기기

사용된 시약은 Monosodium iodoacetate (MIA ; Sigma Co., U.S.A.), Rat cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), PGE2 (Prostaglandin E2) ELISA

Kit (Elabscience, U.S.A.), LTB<sub>4</sub> ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9/Gelatinase B) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat CTX-II (Cross Linked C-telopeptide of Type II Collagen) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat COMP (cartilage oligomeric matrix protein) ELISA kit (MyBioSource Co., U.S.A.), Rat TIMP-1 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1) ELISA Kit (Elabscience, U.S.A.), Rat Glycosaminoglycans ELISA kit (MyBioSource Co., U.S.A.) 등을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany) 등을 사용하였다.

#### 4. 시료 제조

GSH 20첩 (760 g) 기준으로 증류수 10 L를 넣고 4시간 동안 100℃에서 끓인 후 여과액을 얻었으며, 여과액의 500 ml를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 16.23 g(500 ml 대비 수득율 3.24%)을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하며 사용하였다.

#### 5. 시료 처리 및 골관절염 병태 모델 제작

실험그룹은 골관절염을 유발하지 않은 정상군 (이하, Normal), 골관절염 유발 전·후에 증류수만을 경구 투여한 음성대조군 (이하, Control) 및 골관절염 유발 전부터 GSH를 200, 400 mg/kg의 농도로 투여한 실험군으로 나누어 매일 같은 시간에 경구 투여를 진행하였다.

골관절염 병태 모델을 제작하기 위해 마취제 (럼폰 0.1 ml + 케타민 0.4 ml)를 복강 내에 주입하여 마취된 Rat의 오른쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA를 당뇨주사기 (BD insulin syringe)를 사용하여 무릎관절강 내에 60 mg/kg의 농도로 50 μl씩 투여하였으며, MIA 희석에는 0.9% Saline을 사용하였다.

#### 6. 혈액 채취 및 혈청 분리

실험 종료 후 ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 혈액 바이오마커 측정을 진행하기 위해 측정 항목별로 분주하여 초저온 냉동고 (-80℃)에 넣어 보관하였다.

#### 7. 혈청 내 관절염 관련 바이오마커 측정

##### 1) Cytokine 생성량 측정

Cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α) 생성량은 merck

millipore사의 mouse cytokine milliplex map immunoassay kit을 사용하여 제조사의 프로토콜에 맞춰 절차를 수행한 후 Luminex 기기로 측정하였다.

##### 2) PGE<sub>2</sub> 및 LTB<sub>4</sub> 생성량 측정

PGE<sub>2</sub> 및 LTB<sub>4</sub> 생성량은 Elabscience사의 ELISA kit을 사용하여 제조사의 프로토콜에 맞춰 절차를 수행한 후 ELISA reader 기기로 측정하였다.

##### 3) MMP-9, CTX-II, COMP, TIMP-1, GAGs 생성량 측정

MMP-9 및 CTX-II, COMP, TIMP-1, GAGs 생성량은 Mybiosource사의 ELISA kit을 사용하여 제조사의 프로토콜에 맞춰 절차를 수행한 후 ELISA reader 기기로 측정하였다.

### 8. 조직병리학 검사

조직병리학 검사는 혈액 채취 후 경추 탈구 시킨 동물의 우측 대퇴부위와 경골 부위를 절단한 뒤 근육조직을 제거하고 10% 포르말린에 고정시켜 검사전문 업체인 KPNT (Korea)에 의뢰하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색과 Safranin-O 염색을 진행하였다. 염색되어 온 조직슬라이드는 광학현미경을 통해 200배 배율에서 연골 주변과 proteoglycan 등을 확인 후 사진 촬영하였다.

### 9. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 평균값±표준 편차 (mean±S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석한 후, student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였으며, 정상군과 비교한 대조군의 결과는 ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05로 나타내었으며, 대조군과 비교한 실험군의 결과는 \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05로 표기하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 혈청 내 염증 관련 바이오마커

#### 1) Cytokine 생성량

혈청 내 사이토카인 생성량을 측정한 결과, IL-1β는 정상군이 21.6±3.3%, 대조군이 100.0±4.4%, 200 mg/kg 투여군이 38.1±3.0%, 400 mg/kg 투여군이 61.4±2.5%로 나타났으며, IL-6 생성량은 정상군이 67.3±7.0%, 대조군이 100.0±7.8%, 200 mg/kg 투여군이 70.2±5.5%, 400 mg/kg 투여군이 74.2±6.6%로 나타났다. 또한, TNF-α 생성량은 정상군이 50.3±7.5%, 대조군이 100.0±5.9%, 200 mg/kg 투여군이 78.7±9.5%, 400 mg/kg 투여군이 83.9±10.0%로 나타나, GSH를 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 경구 투여한 실험군은 대조군과 대비하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 염

중성 사이토카인 생성을 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 감소시켰다(Table 2).

Table 2. Effects of GSH on serum pro-inflammatory cytokine in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis

Cytokine level (% of control)	Groups			
	Normal	Control	GSH	
			200	400
IL-1 $\beta$	21.6 $\pm$ 3.3	100.0 $\pm$ 4.4 <sup>###</sup>	38.1 $\pm$ 3.0 <sup>***</sup>	61.4 $\pm$ 2.5 <sup>***</sup>
IL-6	67.3 $\pm$ 7.0	100.0 $\pm$ 7.8 <sup>###</sup>	70.2 $\pm$ 5.5 <sup>***</sup>	74.2 $\pm$ 6.6 <sup>***</sup>
TNF- $\alpha$	50.3 $\pm$ 7.5	100.0 $\pm$ 5.9 <sup>###</sup>	78.7 $\pm$ 9.5 <sup>***</sup>	83.9 $\pm$ 10.0 <sup>**</sup>

Luminex assays was used to measure serum levels of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). The measured levels were expressed as percent of the control value (mean  $\pm$  standard deviation, n = 6/group) (<sup>###</sup>p<0.001 indicates a significant difference from the normal group, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, or <sup>\*\*</sup>p<0.01 indicates a significant difference from the osteoarthritis control group).

2) PGE<sub>2</sub> 및 LTB<sub>4</sub> 생성량

혈청 내 PGE<sub>2</sub> 및 LTB<sub>4</sub> 생성량을 측정한 결과, PGE<sub>2</sub> 생성량은 정상군이 734.9 $\pm$ 78.4 ng/ml, 대조군이 3913.0 $\pm$ 209.1 ng/ml, 200 mg/kg 투여군이 1085.0 $\pm$ 151.5 ng/ml, 400 mg/kg 투여군이 988.0 $\pm$ 142.2 ng/ml로 나타났으며(Fig. 1A), LTB<sub>4</sub> 생성량은 정상군이 3797.1 $\pm$ 192.3 pg/ml, 대조군이 5464.5 $\pm$ 377.4 pg/ml, 200 mg/kg 투여군이 2926.4 $\pm$ 208.1 pg/ml, 400 mg/kg 투여군이 3131.7 $\pm$ 430.5 pg/ml로 나타나(Fig. 1B), GSH를 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 경구 투여한 실험군은 대조군과 대비하여 PGE<sub>2</sub> 및 LTB<sub>4</sub> 등의 염증 관련 바이오마커 생성을 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ) 감소시켰다(Fig. 1).

2. 혈청 내 골 파괴 관련 바이오마커

혈청 내 MMP-9 및 CTX-II, COMP 생성량을 측정한 결과, MMP-9 생성량은 정상군이 67.3 $\pm$ 7.2%, 대조군이 100.0 $\pm$ 1.1%, 200 mg/kg 투여군이 91.0 $\pm$ 3.6%, 400 mg/kg 투여군이 87.9 $\pm$ 5.3%로 나타났으며, CTX-II 생성량은 정상군이 50.7 $\pm$ 6.9%, 대조군이 100.0 $\pm$ 5.6%, 200 mg/kg 투여군이 54.4 $\pm$ 5.5%, 400 mg/kg 투여군이 63.7 $\pm$ 5.3%로 나타났다. 또한, COMP 생성량은 정상군이 270.7 $\pm$ 12.9 ng/ml, 대조군이 221.3 $\pm$ 14.0 ng/ml, 200 mg/kg 투여군이 179.1 $\pm$ 17.5 ng/ml, 400 mg/kg 투여군이 178.4 $\pm$ 8.8 ng/ml로 나타나, GSH를 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 경구 투여한 실험군은 대조군과 대비하여 MMP-9, CTX-II, COMP 등의 연골 파괴 관련 바이오마커 생성을 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 감소시켰다(Table 3).

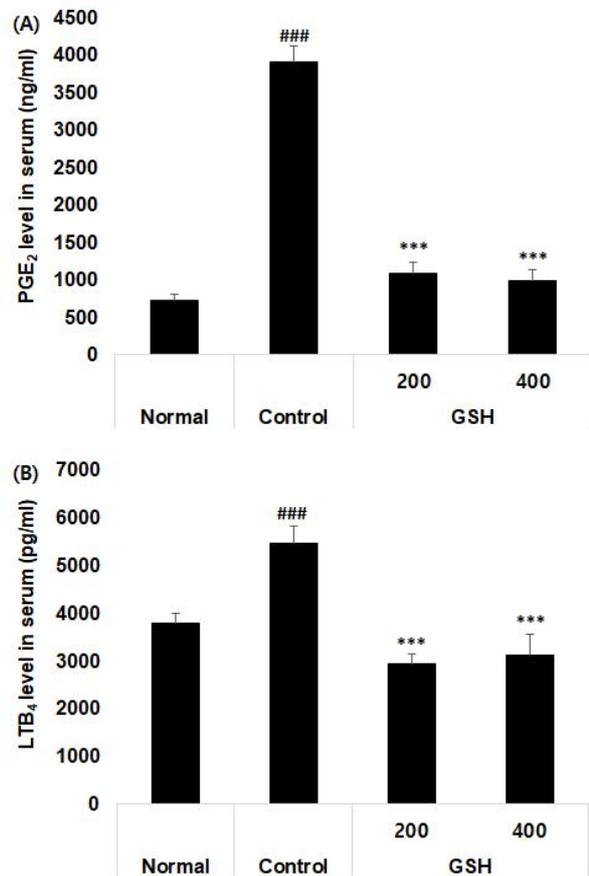


Fig. 1. Effects of GSH on serum inflammatory factors in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure serum levels of prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) (A), and leukotriene B4 (LTB<sub>4</sub>) (B). The measured levels were expressed as percent of the control value (mean  $\pm$  standard deviation, n = 6/group) (<sup>###</sup>p<0.001 indicates a significant difference from the normal group, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 indicates a significant difference from the osteoarthritis control group).

Table 3. Effects of GSH on serum bone degrade factors in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis

Cytokine level (% of control)	Groups			
	Normal	Control	GSH	
			200	400
MMP-9	67.3 $\pm$ 7.2	100.0 $\pm$ 1.1 <sup>###</sup>	91.0 $\pm$ 3.6 <sup>*</sup>	87.9 $\pm$ 5.3 <sup>*</sup>
CTX-II	50.7 $\pm$ 6.9	100.0 $\pm$ 5.6 <sup>###</sup>	54.4 $\pm$ 5.5 <sup>***</sup>	63.7 $\pm$ 5.3 <sup>***</sup>
COMP	270.7 $\pm$ 12.9	100.0 $\pm$ 6.3 <sup>###</sup>	80.9 $\pm$ 7.9 <sup>***</sup>	80.6 $\pm$ 4.0 <sup>***</sup>

Enzyme-linked immunosorbent was used to measure serum levels of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), C-Telopeptide of Type II Collagen (CTX-II), and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). The measured levels were expressed as percent of the control value (mean  $\pm$  standard deviation, n = 6/group) (<sup>###</sup>p<0.001 indicates a significant difference from the normal group, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, or <sup>\*</sup>p<0.05 indicates a significant difference from the osteoarthritis control group).

### 3. 혈청 내 골 파괴 방어 관련 바이오마커

혈청 내 TIMP-1 및 GAGs 생성량을 측정한 결과, TIMP-1 생성량은 정상군이  $168.1 \pm 7.6\%$ , 대조군이  $100 \pm 7.9\%$ , 200 mg/kg 투여군이  $103.3 \pm 2.7\%$ , 400 mg/kg 투여군이  $108.7 \pm 10.1\%$ 로 나타났으며(Fig. 2A), GAGs 생성량은 정상군이  $182.0 \pm 6.8\%$ , 대조군이  $100 \pm 5.0\%$ , 200 mg/kg 투여군이  $115.8 \pm 12.2\%$ , 400 mg/kg 투여군이  $111.2 \pm 12.2\%$ 로 나타나(Fig. 2B), GSH를 200 mg/kg과 400 mg/kg으로 경구 투여한 실험군은 대조군과 대비하여 연골 파괴 관련 바이오마커인 GAGs 생성을 유의성 있게 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 증가시켰으나 TIMP-1 생성은 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

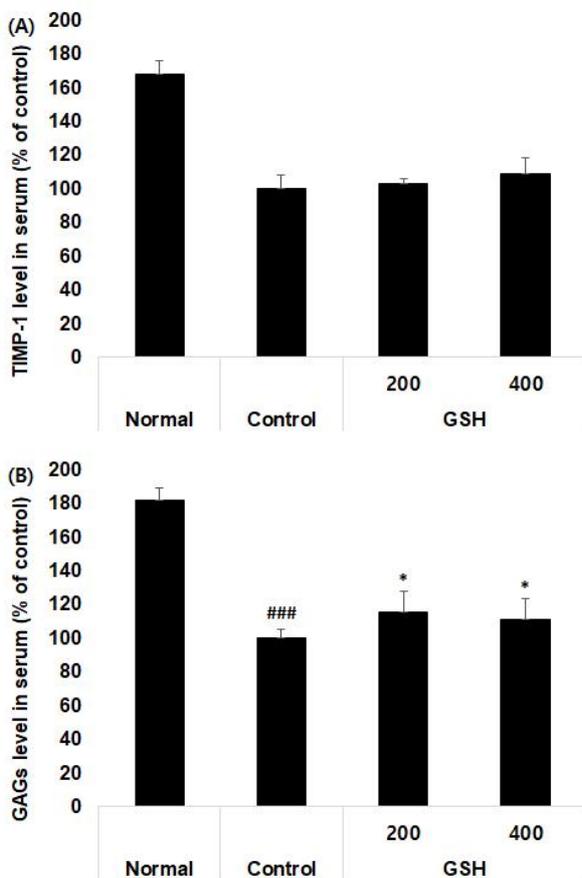


Fig. 2. Effects of GSH on serum bone defence factors in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Enzyme-linked immunosorbent was used to measure serum levels of Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1), and glycosaminoglycans (GAGs). The measured levels were expressed as percent of the control value (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 6$ /group) (### $p < 0.001$  indicates a significant difference from the normal group, \* $p < 0.05$  indicates a significant difference from the osteoarthritis control group).

### 4. 조직변화에 미치는 영향

무릎 연골 조직 변화를 H&E 및 safranin-O 염색을 통해 확인한 결과, 정상군은 대조군과 GSH 투여군과 대비하여 연골 (Fig. 3A-동그라미)과 연골 주변으로 proteoglycan의 보존 (Fig. 3B-동그라미)이 잘 되어 있는 것이 관찰되었다. 상대

적으로 GSH 투여군은 대조군과 대비하여 정상군에 가까운 연골 및 proteoglycan 손실이 적은 것으로 관찰되었다(Fig. 3)

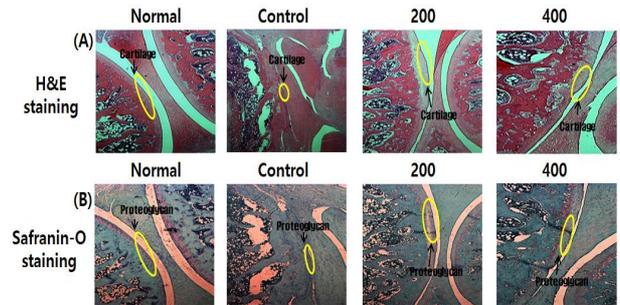


Fig. 3. Histopathological effects of GSH on knee joints in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced rat model of osteoarthritis. Representative histological images of knee joint tissues were stained using hematoxylin and eosin (A) or safranin-O (B) (magnification, 200 $\times$ ).

## IV. 고찰

골관절염은 주로 고관절, 손가락, 무릎 등 장기간 지속적인 사용을 하는 관절 부위에 발생하며, 연골뿐만 아니라 인대, 근육, 활액 등 관절을 구성하는 요소들로 인해 더욱 심화되어 심한 통증을 수반한 채 관절의 운동범위를 제한하게 된다<sup>15,16</sup>.

이러한 골관절염은 손상된 연골세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 염증성 cytokine들이 다량으로 생성되어 염증 매개물질의 생성 촉진 및 MMPs의 생성을 유의하게 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>.

본 시료인 氣血疏通丸은 祛風濕止痛, 強筋骨 약물을 중심으로 처방이 구성되어 현재 골관절염에 활용되고 있는 임상방이다. 따라서 본 연구는 새로운 치료제 개발이 아닌 현재 활용되고 있는 처방의 객관적인 효능과 치료기전을 규명하여 EBM (Evidence-Based Medicine)을 구축하는데 목적이 있다.

氣血疏通丸의 구성 약재 중 蔓荊子<sup>17</sup>, 薄荷<sup>18</sup>, 秦艽<sup>19</sup>, 白芥子<sup>20</sup>, 黃芪<sup>21</sup>, 當歸<sup>22</sup> 등은 항염증 혹은 항산화 효능이 규명된 바가 있고, 또한 羌活<sup>23</sup>, 獨活<sup>23</sup>, 香附子<sup>24</sup>, 白芷<sup>25</sup>, 甘菊<sup>26</sup>, 仙茅<sup>27</sup>, 防風<sup>28</sup>, 杜仲<sup>29</sup>, 白芍藥<sup>30</sup>, 薑黃<sup>31</sup>, 黃柏<sup>32</sup> 등도 단일 약재, 약침, 처방 등으로 관절염에 대한 유효성이 입증된 바가 있다.

본 연구에서는 MIA로 골관절염을 유도한 랫 동물 병태 모델을 활용하여 GSH를 경구 투여하여 골관절염 유관 인자 및 형태학적 관찰을 통해 염증, 골 파괴 및 골 파괴 방어 등에 대한 효능을 혈액 바이오마커 및 조직병리학적 검사를 통해 확인하였다.

골관절염의 주된 원인으로 알려진 염증에 의한 발생은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 염증성 cytokine이 다량으로 생성되어 연골세포, 대식세포, 골아세포 및 활막 조직에 작용함으로써 관절 파괴에 주된 역할을 한다<sup>33-35</sup>. 특히, IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 는 골관절염에서 중요한 역할을 하고 있는데 이들의 과량 생성은 염증 매개 인자인 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub> 등의 합성을 촉진하여 proteoglycan을 소실시키고 재합성을 억제하며, MMPs의 활성화 및 생성을 증가시킴으로써 관절염증을 증폭시킴과 동

시에, 연골 기질파괴를 일으킨다. 또한, IL-6의 분비를 촉진하여 골 회복 및 생성을 방해하는 것으로 알려져 있다<sup>35,36</sup>. 본 연구에서 GSH 투여군은 대조군과 대비하여 염증성 cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 감소시켜 골 관절염의 주된 증상인 염증 반응을 억제하였다(Table 2), .

또한, 염증 반응의 중요한 매개물질인 PGE<sub>2</sub>는 손상 부위나 조직에서 통증과 발열 전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>37,38</sup>, LTB<sub>4</sub>는 lipoxygenase의 활성화에 따른 주요 산물로서 염증 반응에서 호산구 및 호중구에 대하여 강력한 유주성 특성을 갖는 성분으로 알려져 있으며 세포의 화학주성에 필요한 여러 인자들과 세포부착인자의 발현에 영향을 주어 치주염, 류마티스관절염 및 다수의 염증성 질환을 일으켜 골 손실 질환에 핵심적 기능을 하는 인자로 알려져 있다<sup>8,39</sup>. 본 연구에서 GSH 투여군은 대조군과 대비하여 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub>의 생성량을 유의성 있게 감소시켜 앞선 염증성 cytokine 결과인 염증에 의한 골관절염 질환을 개선하는 효능이 있음을 뒷받침하고 있다(Fig. 1A, B).

GSH의 투여가 염증 반응을 억제하여 골관절염 치료에 대한 가능성이 입증됨에 따라 골 파괴 및 골 파괴 방어 인자 등을 다각도로 검증하여 골관절염에 대한 효능을 증명하고자 다양한 인자를 추가로 확인하였다.

연골의 파괴는 우선 MMPs 합성 및 활성화에 의해 파괴되는데 이러한 현상은 염증성 cytokine에 의해 유발된다. 연골 세포는 sulfated proteoglycan, type II collgen 등의 연골 특이적 단백질로 합성되어 조직을 이루게 되는데, 관절조직의 파괴는 주로 연골 내 콜라겐의 소실로 인해 발생한다<sup>40-44</sup>. 또한 골관절염이 지속되면 연골에 포함된 단백질 성분인 COMP의 발현량이 증가하여 혈액 검사를 통해 연골마모 정도, 손상 및 진행 여부 등을 예측할 수 있는 아주 중요한 바이오마커로 알려져 있다<sup>45,46</sup>. 본 연구에서 GSH 투여군은 대조군과 대비하여 MMP-9 및 CTX-II, COMP 등의 생성량을 유의성 있게 감소시켜 본 시료가 항염증 작용과 더불어 연골 파괴 억제 효능이 있음을 나타내고 있다(Table 3).

TIMP-1은 세포의 기질을 재건하는 MMPs의 내적인 길항제로서 골 파괴를 지연하거나 형성하는 것으로 알려져 있다. IL-1 $\beta$ , IL-6는 내피세포에서 TIMP 생산을 억제하는 반면 활액 및 연골세포에서는 TIMP의 발현을 증가시키고 상위 염증 매개 인자인 TNF- $\alpha$ 는 TIMP의 발현을 억제하는 반면 MMP의 발현을 증가시킨다. 이러한 MMPs와 TIMP의 활동 사이의 불균형이 골관절염의 병리적 메커니즘으로 이해되고 있다<sup>47</sup>. 그러나 본 연구에서 TIMP-1 생성량은 대조군과 GSH 경구 투여군 사이의 차이가 나타나지 않았는데, 이는 GSH가 TIMP 자극을 통하지 않고 MMPs의 발현을 직접적으로 조절한다는 것을 나타내고 있어 GSH가 MMPs 생산을 감소시켜 조직 재생 및 연골, 뼈 파괴에 결정적인 역할을 할 수 있음을 시사한다(Fig. 2A).

GAGs는 관절연골에서 주로 탄력성과 관련되어 콜라겐을 보호하는 작용을 하며, 또한 관절 연골의 주요 성분인 proteoglycan을 생성하는 것으로 알려져 있다<sup>48,49</sup>. 본 연구에서 GSH 투여군은 대조군과 대비하여 GAGs 생성량을 유의성 있게 증가시켜 연골 회복에 대한 효능이 확인되었다(Fig. 2B).

이와 같은 혈액 바이오마커 결과를 통해 GSH의 경구 투여가

염증 반응, 골 파괴 및 방어 등에 효능이 확인되어 이를 더욱 자세히 증명하고자 H&E, Safranin-O 등의 염색을 통해 조직병리학적 검사를 진행하였다. 조직병리학 소견 결과, 정상군은 대퇴골, 경골, 연골 및 활막 조직 등의 손실이 나타나지 않았으나 대조군과 GSH 투여군은 연골과 연골 주변의 proteoglycan의 손실이 관찰되었다. 그러나 상대적으로 GSH 투여군은 대조군 대비 연골마모와 proteoglycan의 손실이 적은 것으로 나타나 혈액 바이오마커 결과와 부합되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, GSH은 골관절염 병태 동물 모델을 통해 대표적인 원인이라 할 수 있는 염증 반응 (염증성 cytokine 및 염증 매개 인자)의 생성량 감소와 동시에 골 파괴를 일으키는 대표적 인자 역시도 감소시키며 동시에 연골 파괴를 방어할 수 있는 효능이 혈액 및 조직병리학 결과를 통해 입증되었다. 현재 임상에서 활용되고 있는 GSH에 대한 객관적인 본 연구결과는 추후 치험 사례연구가 보완 된다면 골관절염에 대한 경제/사회적으로 손실을 보완해 줄 한의학 치료제로써 상용화가 가능할 것으로 판단된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 氣血疏通丸 (GSH)이 골관절염에 대한 효과를 객관적으로 증명하고자 관절염을 유발한 동물모델을 통해 혈액 및 조직학적 평가를 진행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GSH 투여군은 대조군과 대비하여 염증성 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 및 염증 매개 인자인 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> 등의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
2. GSH 투여군은 대조군과 대비하여 골 파괴 관련 인자인 MMP-9, CTX-II, COMP 등의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
3. GSH 투여군은 대조군과 대비하여 골 파괴 방어 관련 인자인 TIMP-1 생성량은 차이가 나타나지 않았으나, GAGs 생성량을 유의성 있게 증가시켰다.
4. GSH 투여군은 대조군과 대비하여 H&E 및 safranin-O 염색을 통해 연골의 파괴가 적고 proteoglycan 손실이 적게 나타났다.

이상의 결과들로 보아 GSH 투여는 염증 및 골 관련 대사 질환에 유의적인 영향을 주어 골관절염을 치료할 수 있는 임상 방법이 실험적으로 규명되었다. 따라서 현재 임상에서 활용되고 있는 GSH가 EBM (Evidence-Based Medicine)을 구축에 일조할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

## References

- Gwon JS, Kim GH, Bijeung. Seoul: Dose publisher. 1993 : 249-51.
- Sim BY, Bak JW, Lee HJ, Jun JA, Choi HJ, Kwon CJ, Kim HY, Kevin JR, Kasrsten B, Kim DH. Effects of natural eggshell membrane on monosodium iodoacetate-arthritis in rats. *Journal of Nutrition and Health*. 2015 ; 48(4) : 310-18.
- Health Insurance Review & Assessment Service. Information. 2016 : 53-71.
- Jang GE, Kim CH, Lim HJ, Roh MT. The Arthritis Helpbook. Seoul: Do Seo publisher. 2003 ; 334-404.
- Wu GW. Experiment Study on Effect of Duhuo Jisheng Decoction on Osteoarthritis Chondrocyte Proliferation and Apoptosis. 2014.
- Tao XH, Fengshibing. Beijing: renminweisheng publisher. 2004 ; 1-2.
- Sim BY, Choi HJ, Ji JG, Kim DH. Effects of Yeonsan Ogye on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2017 ; 32(2) : 41-47.
- Won JH, Woo CH. Effects of Gyejigabuja-tang on MIA-induced Osteoarthritis in Rats. *The Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2015;25(2): 51-64.
- Lee EJ, Oh MS. Effects of Keonbodan on MIA-Induced Osteoarthritis in Rat. *The Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2014 ; 24(2) : 51-64.
- Woo CH, Woo MS. Effects of Bujasasim-tang Ethanol Extract on Oxidative Stress, Inflammation and Osteoarthritic Rat Model. *The Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2015 ; 25(2) : 15-35.
- Lee HE, Oh MS. Effects of Mahwangbujaseshin-tang on MIA-Induced Osteoarthritis Rats. *The Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2014 ; 24(2) : 65-81.
- Kim DH, Jeong SH, Seo IB, Kim SJ. Suppression Effects of Sopughwalhyeol-tang(Shufenghuoxie-tang) on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. *The Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2011 ; 21(1) : 57-77.
- Gwon HJ. Bonchohak. Do Seo publisher. 2004.
- Chen SL, Lin SL. Quintessence of Materia Medica. Military Medical Science Press. 2006.
- Feranandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002 ; 39(1-2) : 237-46.
- Kim MG, Seo IB, Leem KH, Jeong TJ, Kim JS. Effects of *Achyranthis Japonicae Radix*-containing mixture on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2017 ; 32(1) : 83-89.
- Yeon KJ, Jung HA, Roh SS. The Effects of *Vitex rotundifolia* Linne fil. Extract on the Inflammatory and Allergic Reactions. *Daejeon University Hanuihakyeonguso*. 2013 ; 22(1) : 145-170.
- Lee SE, Han HS, Jang IB, Kim GS, Son YD, Park CB, Seong NS. In vitro Antioxidant Activity of *Mentha viridis* L. and *Mentha piperita* L. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2005 ; 13(6) : 255-60.
- Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*. 2008 ; 109(3) : 447-83.
- Jeong IY, Lee JS, Oh H, Jung UH, Park HR, Jo SK. Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Paeonia japonica* on Oxidative Stress and Identification of Its Active Components. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2003 ; 32(5) : 739-44.
- Sim BY, Choi HJ, Bak JW, Kim DH. Effects of GamiBangkeeHwangkee-tang ethanol extract on Collagen-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. *The Korea Journal of Herbology*. 2014 ; 29(6) : 95-102.
- Choi YJ, Roh JD. Effects of *Angelicae Gigantis Radix* pharmacopuncture on Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Macrophage. *The Journal of Pharmacopuncture*. 2011 ; 14(3) : 81-90.
- Yoon HS, Lee YC, Lee JC. Inhibitory Effect of a Decoction Combined with *Ostericum koreanum* Maxim. and *Aralia continentalis* Kitagawa on Collagen II-induced Arthritis Mice. *Herbal Formula Science*. 2013 ; 21(1) : 161-176.
- Kim JH, Lee H. A Study of Herbal-acupuncture with *Cyperus Rhizoma* Infusion Solution on Osteoporotic Rats Induced by Ovariectomy. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2008 ; 25(2) : 243-57.
- Kim TH, Lee BR, Lee H, Yin YK. A Study on the Effect of *Angelicae Radix* Pharmacopuncture at Joksamni(ST36) on Collagen-induced Arthritis in DBA/1J Mice. *The Korean Journal of Acupuncture*. 2007 ; 24(3) : 179-204.
- Park SY, Cho YJ. Anti-Gout Effect of Ethanol Extracts from *Chrysanthemum indicum* Linne. *Journal of Korean Society Food Science and Nutrition*. 2016 ; 45(6) : 797-504.
- Seo BI, Roh SS, Park JH, Park CI, Koo JS. Research of Efficacy of *Curculiginis Rhizoma* aquaous extract on collagen induced arthritis. *The Korea Journal of Herbology*. 2016 ; 31(4) : 1-10.
- Cho SM, Lee IS. Suppression of Collagen-induced Arthritis by Continuous Administration of

- Daebangpoong-tang. The Journal of Korean Medicine Rehabilitation, 2000 ; 10(2) : 111-120.
29. Lee BK, Lee YC, Lee JC. Inhibitory Effect of a Decoction of *Eucommiae ulmides* OLIVER and *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T.M.Ai on Collagen II-induced Arthritis Mice. The Korea Journal of Herbology, 2010 ; 25(1) : 55-63.
  30. Park BR, Park GH, Gu DR, Go YM, Kim YC, Lee SH. Inhibitory Effect of *Paeoniae Radix Alba* Ethanol Extract on Osteoclast Differentiation and Formation. Korean Journal of Oriental Medical Pathology, 2015 ; 29(1) : 51-57.
  31. Anandakumar S, Joseph JA, Bethapudi B, Agarwal A, Jung EB. Anti-inflammatory Effects of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extract on Acute and Chronic Inflammation Models. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2014 ; 43(4) : 612-17.
  32. Kim JY, Lee H. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with *Phellodendri Cortex* Solution on Collagen-induced Arthritis in DBA/1J Mice. The Korean Journal of Meridian & Acupoint, 2007 ; 24(2) : 163-184.
  33. Ayril X, Pichering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. Osteoarthritis & Cartilage, 2005 ; 13(5) : 361-67.
  34. Pozgan U, Caglic D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Biological Chemistry, 2010 ; 391(5) : 571-79.
  35. Lee YK, Kim CT, Choi HJ. Anti-Inflammatory Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* 80% Ethanol Extract in RAW 264.7 cells. The Korea Journal of Herbology, 2017 ; 32(3) : 97-103.
  36. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Adriana OL, Duchatelle V, Degott C, Gravallesse E, Mathis D, Benoist C. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody induced arthritis. Journal of Experimental Medicine, 2002 ; 196(1) : 77-85.
  37. Kontny E, Rudnicka W, Kowalczewski J, Marcinkiewicz J, Maslinski W. Selective inhibition of cyclooxygenase 2-generated prostaglandin E2 synthesis in rheumatoid arthritis synoviocytes by taurine chloramine. Arthritis and Rheumatism, 2003 ; 48(6) : 1551-55.
  38. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. Trends in Molecular Medicine, 2008 ; 14(10) : 461-69.
  39. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. Arch Biochem Biophys, 2001 ; 385(2) : 231-41.
  40. Smith DR. Degradative enzymes in osteoarthritis. Frontiers in Bioscience, 1999 ; 4: 704-12.
  41. Meyer FA, Yaron I, Yaron M. Synergistic, additive, and antagonistic effects of interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and  $\gamma$ -interferon on prostaglandin e, hyaluronic acid, and collagenase production by cultured synovial fibroblasts. Arthritis & Rheumatology, 1990 ; 33(10) : 1518-25.
  42. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. Journal of Experimental Medicine, 1985 ; 162(6) : 2163-68.
  43. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts: synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. Journal of Biological Chemistry, 1990 ; 265(28) : 17238-45.
  44. Zhang YH, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential Regulation of Monocyte Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 Production by TNF- $\alpha$ , Granulocyte-Macrophage CSF, and IL-1 $\beta$  Through Prostaglandin-Dependent and-Independent Mechanisms. Journal of Immunology, 1998 ; 161(6) : 3071-76.
  45. Sharif M, Saxne T, Shepstone L, Kirwan JR, Elson CJ, Heinegard D, Dieppe PA. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Rheumatology, 1995 ; 34(4) : 306-10.
  46. Vandooren B, Kruithof E, Yu, DTY, Rihl M, Gu J, Rycke LD, Bosch FVD, Veys EM, Keyser FD, Baeten D. Inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade in spondylarthropathy. Arthritis & Rheumatology, 2004 ; 50(9) : 2942-53.
  47. Shingu, M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cell. Clin & Experimental Immunology, 1993 ; 94(1) : 145-49.
  48. Helminen HJ, Hyttinen MM, Lammi MJ, Arokoski JPA, Lapvetelaine T, Jurvelin J, Kiviranta I, Tammi MI. Regular joint loading in youth assists in the

establishment and strengthening of the collagen network of articular cartilage and contributes to the prevention of osteoarthrosis later in life: a hypothesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2000 ; 18(5) : 245-57.

49. Kim BS, Choi HI. Effect of Intra-articular Injection of Sodium Hyaluronate and polysulfated Glycaosaminoglycan in Equine Degenerative Joint Disease. *The Korean journal of veterinary clinical medicine*, 1991 ; 8(1) : 11-26.