

# 진교·위령선·하고초 복합방이 MIA 유발 골관절염 모델에서 중추신경내 통증관련물질에 미치는 영향

박원태 · 정수현 · 서일복<sup>1</sup> · 김순중\*

세명대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, 1: 해부학교실

## GCP Treatment on the Expression of NOS, C-fos, Serotonin and Substance-P in Central Nerve System of Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritic Pain Model

Won Tae Park, Su Hyeon Jeong, Il Bok Seo<sup>1</sup>, Soon Joong Kim\*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, 1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Semyung University

This study was carried out to investigate the effects of GCP treatment on the expression of NOS, c-fos, serotonin and substance P in central nerve system of monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritic pain model. Arthritis was induced by injection of MIA(0.5 mg) into knee joint cavities of rats. Arthritic rats were divided into control(n=8) and treated(n=8) group. Control group was taken distilled water for 20 days. Treated group was taken extracts of GCP by orally for same duration. Normal group(n=8) was infected with normal saline and was taken distilled water for 20 days. The numbers of NADPH-d positive cells in superficial dorsal horn of spinal cord of treated group(21±5) was significantly (p<0.01) decreased compared with control(33±5). The numbers of NADPH-d positive cell in dorsolateral periaqueductal gray matter of treated group(111±16) was significantly(p<0.01) decreased compared with control(143±14). The numbers of c-fos positive cells in dorsal periaqueductal gray matter of treated group(57±16) was significantly(p<0.01) decreased compared with control(78±13). The numbers of c-fos positive cells in paraventricular thalamic nucleus of treated group(60±15) was significantly decreased compared with control(88±27). The numbers of serotonin positive cells in median raphe nucleus of treated group(171±31) was significantly(p<0.05) decreased compared with control(217±48). On the basis of these results, we concluded that GCP treatment has inhibiting effects on the pain transmission in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain model in rat.

Key words : monosodium iodoacetate, osteoarthritis, NADPH-d, c-fos, serotonin

### 서 론

골관절염은 가장 흔한 관절 질환으로 전체 근골격계 질환 중에서 골다공증 못지 않게 흔하며, 65세 이상의 과반수와 75세 이상의 80%가 골관절염 환자이다. 점차 고령화 사회가 되어감에 따라 환자는 더 증가할 것으로 예상된다<sup>1,2)</sup>.

현재까지 골관절염의 치료목적은 관절의 구조적 손상을 회복시켜주는 방향이 아니고 증상완화에 초점을 맞추어 통증을 줄

이고, 질병의 진행을 지연, 관절기능과 삶의 질을 유지시키는데 있어왔다. 하지만, 최근 골관절염의 병인에 대한 연구가 깊어짐에 따라 병의 진행 자체를 차단하거나 지연시키고, 관절연골 손상을 회복시킬 수 있는 새로운 치료법들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>3,6,25)</sup>.

골관절염의 병태생리는 한의학에서 筋骨, 肌肉, 肢體 및 관절 등에 疼痛, 重着, 麻木, 關節腫脹, 屈伸不利, 發赤 및 熱感 등의 증상을 발생하는 痺病證의 범주에서 이해되었으며, 치료에 있어서도 痺證의 치료방법을 주로 활용해 왔다<sup>1)</sup>.

본 실험의 선행 연구에서 진교·위령선·하고초 복합방(GCP)은 청열, 거풍습의 효능을 가진 痺證에 활용될수 있는 약물이며,

\* 교신저자 : 김순중, 충청북도 제천시 신월동 세명대학교 부속한방병원

· E-mail : vr402956@hanmail.net, · Tel : 043-649-1920

· 접수 : 2007/09/10 · 채택 : 2007/11/20

다양한 골관절염 치료 처방에서 다용되는 약물들이다<sup>45)</sup>. 실험적으로도 흰쥐의 MIA 유발 골관절염의 병리발생에서 연골의 변성을 막음으로써 골관절염의 진행을 억제시키는 효과가 확인되었고<sup>10)</sup>, 진교, 위령선, 하고초는 개별적으로 중뇌수도관 회백질에서 NOS를 억제하는 작용이 있다고 보고되었다<sup>11-16)</sup>. 이에 저자는 GCP 복합방의 임상적 활용도를 높이기 위해 통증 전달과정에 대한 제어효과가 있는지를 중추신경내 NOS, C-fos, serotonin, substance P를 측정하여 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 180 g 내외의 숫컷 Sprague-Dawley Rat(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 항온항습사육장치(대중기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용한다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유롭게 섭취케 한다.

### 2. 골관절염 통증 모델의 작성

골관절염 통증 모델은 Janusz 등의 방법<sup>36)</sup>에 준하여 유발하였다. 실험개시일에 monosodium iodoacetate(MIA)을 주사용 saline에 10 mg/ml 농도로 용해하여 양측 슬관절강내로 각각 0.05 ml을 주입하여 골관절염 통증 모델을 작성하였다.

### 3. 검액의 제조

실험에 사용한 복합방(GCP)은 진교, 위령선 및 하고초로 구성하였으며 약제는 세명대학교 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. GCP처방의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

GCP 4첩 분량(240 g)을 2000 ml의 증류수에 1시간 동안 침지시킨 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심하여 침전된 성분을 제거한 후 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)로 100 ml로 농축시켰다. 이 농축액 1 ml을 흰쥐 마리 당 1일 투여량으로 하였다. 이 용량은 체중 비례로 환산하여 60 kg 성인의 1일 복용량에 5배에 해당되는 용량이다.

Table 1. Prescription of GCP-Tang Per Pack

Name of Herbs	Weight(g)
진교	20
위령선	20
하고초	20
Total	60

### 4. 실험군의 분류

실험개시일에 체중을 측정하여 각 군당 체중이 고르게 8마리씩을 배정한 후 아래와 같은 처치를 하였다.

- 정상군(Noraml Group) : Saline 0.05 ml을 양측 슬관절 강내에 주사하고 20일간 1일 1회 증류수 1 ml 을 경구투여한 음성대조군.

- 대조군(Control Group) : MIA 0.05 ml 을 양측 슬관절 강내

에 주사하고 20일간 1일 1회 증류수 1 ml 을 경구투여하여 골관절염 통증 모델을 작성한 양성대조군.

- GCP군(GCP Treated Group) : MIA 0.05 ml 을 양측 슬관절 강내에 주사하고 20일간 1일 1회 GCP 농축액 1 ml 경구투여한 처치군.

## 5. 검사 항목 및 방법

### 1) 표본의 처리

실험 종료일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시킨 상태에서 전혈을 심장을 통해서 채혈하고 0.05 M PBS(pH 7.5)로 심장을 통해서 5분간 관류하였다. 이어서 4% paraformaldehyde 용액으로 10분간 관류 고정하고 슬관절, 뇌 및 척수를 적출하였다.

뇌 및 척수는 동일한 고정액에서 4℃에서 24시간 후고정 하였다. 후고정된 뇌 및 척수를 15% sucrose 용액에 1일간, 30% sucrose 용액에 2일간 침지시켜 냉동 손상을 예방하고 뇌 및 제 3-5척수 분절을 30 μm 두께의 냉동연속절편을 제작하였다.

### 2) 골관절염의 육안 및 조직학적 확인

적출된 우측 슬관절을 10% 중성포르마린용액으로 24시간 재고정한 후 경골의 관절연골 표면이 노출되도록 깨끗이 정리하여 사진촬영하여 육안적으로 골관절염의 발생을 확인하였다.

좌측 슬관절은 20% 개미산 용액에 3일간 침지하여 탈회시킨 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 슬관절 절단면을 파라핀 포매하였다. 파라핀 포매 조직을 5 μm 두께의 박절편을 만든 후 Hematoxylin & Eosin 염색하여 광학현미경으로 골관절염의 발생을 확인하였다.

### 3) NADPH-d 조직화학

중추신경내에서 nitric oxide synthase(NOS) 발현을 확인하기 위하여 NADPH-d 조직화학을 자유부유법(free floating technique)으로 실시하였다. 냉동절편조직을 0.05 M PBS(pH 7.5)로 5분씩 3회 세척하고 0.1% β-NADPH, 0.01% nitroblue tetrazolium, 0.3% Triton X-100을 0.1 M PB(pH 7.4)에 녹인 반응 혼합액에 넣어 37℃에서 6시간 반응시켰다. 조직을 PBS로 5분씩 3회 세척하고 poly-L-lysine이 처리된 슬라이드에 부착시켜 건조시키고 투명화 과정을 거쳐 synthetic mountant(Shandon Inc., USA)로 봉입하고 광학현미경으로 NADPH-d 양성세포수를 계수하였다.

척수에서는 중심관주위회백질(gray matter around central canal) 및 천층후각(superficial dorsal horn)에서, 중뇌에서는 배측술기핵(dorsal raphe nucleus) 및 배외측중심관주위회백질(dorsolateral periaqueductal gray matter)에서, 시상하부에서는 뇌실주위시상하부핵(periventricular hypothalamic nucleus)에서 NADPH-d에 양성으로 염색되는 세포수를 계수하였다.

### 4) C-fos, Serotonin 및 Substance P 면역조직화학

조직절편을 0.05M PBS(pH 7.5)로 5분씩 3회 세척하고 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 30분간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 C-fos, serotonin 및 substance P에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

비특이 반응을 억제하기 위해서 조직절편을 일차항체가 제

조된 동물의 정상 혈청(3% normal serum)으로 30분간 반응시킨 후 가볍게 세척하고 일차 항체를 도포하여 4℃에서 24시간 반응시켰다. 일차항체로 사용된 rabbit polyclonal anti-C-fos(Santa Cruz Biotechnology INC., USA)는 1:500배, rabbit polyclonal anti-serotonin(Oncogene Research Product, UK)는 1:10,000배, rat monoclonal anti-substance P(BD Biosciences, USA)는 1:500 배로 각각 희석하여 사용하였다.

일차 항체 반응 후 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG 또는 anti-rat- IgG를 일차항체의 종류에 따라 각각 상온에서 30분간 반응시키고 ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05 M PBS butter(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 5분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

C-fos 양성세포수는 척수의 천층후각(superficial dorsal horn) 및 심층후각(deep dorsal horn)에서, 중뇌의 배측중심관주위회백질(dorsal periaqueductal gray matter) 및 복측중심관주위회백질(ventral periaqueductal gray matter)에서, 대뇌의 치상회(dentate gyrus) 및 뇌실강주위시상핵(paraventricular thalamic nucleus)에서 각각 계수하였다.

Serotonin 양성세포수는 중뇌의 배측솔기핵(dorsal raphe nucleus) 및 정중솔기핵(median raphe nucleus)에서 각각 계수하였다.

Substance-P 양성 반응은 척수 리사우어로(Lissaur's tract) 및 천층후각에 분포된 신경종말에 미세한 갈색의 과립상 형태로 나타나 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 양성 반응의 강도를 측정하였다. 척수의 리사우어로 및 천층후각에서 substance-P에 염색된 부위의 광선 투과도를 측정하고, 정상군에서 측정된 투과도의 평균을 100%로 기준하여 대조군과 처치군의 투과도를 환산하여 양성반응의 정도를 표시하였다.

6. 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.0 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다.

결 과

1. MIA로 유발된 골관절염의 육안 및 조직학적 소견

육안 소견에서 정상군의 경골 관절연골은 매끈한 상태를 유지하였으나, 대조군의 경골 관절연골은 연골의 중심부를 중심으로 색조가 변색되어 있었으며 전반적으로 거칠은 상태를 보였다. 부위에 따라서는 관절연골이 깊게 함몰되어 있었다(Fig. 1-1).

조직학적 소견에서 정상 관절연골은 연골세포의 성숙 및 배열이 잘 이루어져 있었다(Fig. 1-2). 대조군의 연골조직은 대부분이 변성되어 연골세포의 구조가 상실되거나 연골소강이 확장되어 관찰되었으며, 많은 부위에서 변성된 연골 조직간에 균열이 발생되어 있었다(Fig. 1-3).

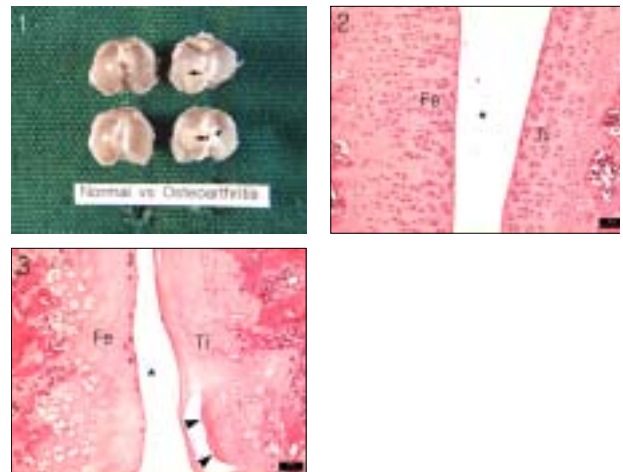


Fig. 1. Gross structure of normal and MIA-induced osteoarthritic joints(1): Degeneration (arrows) and destruction (arrow head) of articular cartilage of tibia are shown. Compare the surface of cartilage than those of normal tibia. Histological structure of normal joint(2): Note developed articular cartilage of femur(Fe) and tibia(Ti). Histological structure of MIA-induced osteoarthritic joint(3): Note degeneration and necrosis of articular cartilage of femur(Fe) and tibia(Ti), and desquamation of degenerative cartilage (arrow heads). \* : joint cavity. HE stain, bar=30 μm.

2. NADPH-d 양성 세포수의 변화

NADPH-d 양성 세포수는 Table 2와 같다.

척수 중심관주위회백질에서의 NADPH-d 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다. 척수 천층후각에서의 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2-4 & 2-5).

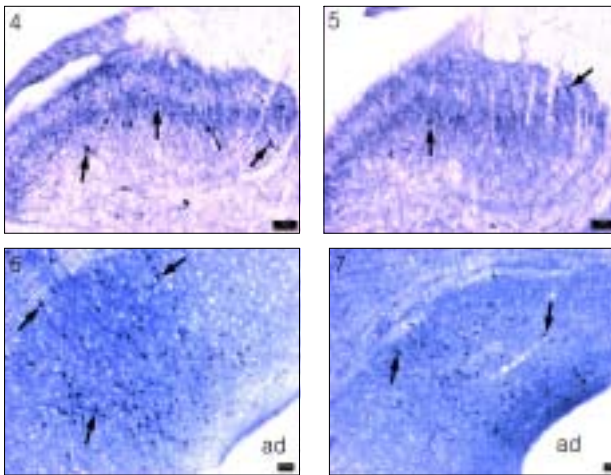
중뇌 배측솔기핵에서의 NADPH-d 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군 및 처치군에서 증가되었으나 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었다. 배외측중심관주위회백질에서의 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2-6 & 2-7).

뇌실강주위시상하부핵에서의 NADPH-d 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군은 증가되었으며, 처치군은 감소되었으나 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었다.

Table 2. Effects of GCP Treatment on the Number of NADPH-d positive Neurons in Central Nervous System of Monosodium Idoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Pain in Rats

Group	Spinal Cord		Mid Brain	Hypothalamus	
	Around Central Canal	Superficial Dorsal Horn	Dorsal Raphe Nucleus	Dorsolateral PAG	Periventricular Nucleus
Normal (n=8)	5±2 <sup>a)</sup>	20±4	51±19	106±12	27±11
Control (n=8)	7±1*	33±5***	63±29	143±14***	31±6
Treated (n=8)	7±2	21±5###	44±19	111±16##	29±8

<sup>a)</sup> : data expressed as Mean±S.D. PAG ; periaqueductal gray matter, Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIAinjected and treated with distilled water, Treated : MIA injected and treated with GCP, \* : Statistically significant compared with normal group(\*p<0.05, \*\*\*p<0.001), # : Statistically significant compared with control group(##p<0.01, ###p<0.001)



**Fig. 2. Microphotograph of NADPH-d expression of control group(4):** Many neurons (arrows) in superficial dorsal horn of spinal cord positively reacted with NADPH-d. **Microphotograph of NADPH-d expression of GCP treated group(5):** The numbers of NADPH-d positive neurons(arrows) were decreased in superficial dorsal horn of spinal cord. Compare with control group(4). **Microphotograph of NADPH-d expression of control group(6):** Many neurons (arrows) in dorsolateral periaqueductal gray matter positively reacted with NADPH-d. ad : cerebral aqueduct. **Microphotograph of NADPH-d expression of GCP treated group(7):** The numbers of NADPH-d positive neurons(arrows) were decreased in dorsolateral periaqueductal gray matter. Compare with control group(6). ad : cerebral aqueduct. NADPH-d histochemical stain, bar = 30  $\mu$ m.

3. C-fos 양성 세포수의 변화

C-fos 양성 세포수는 Table 3과 같다.

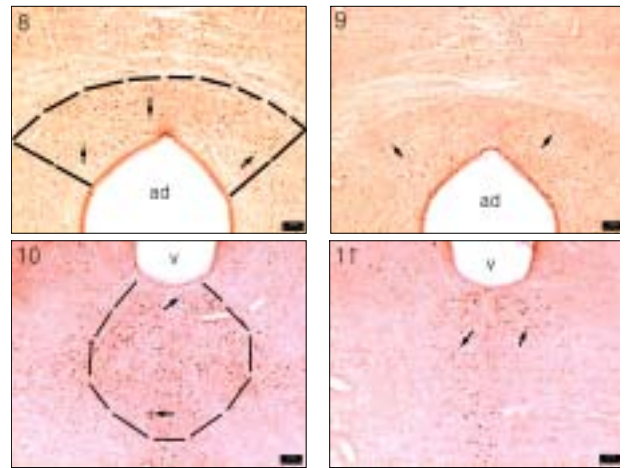
척추 천층후각에서의 c-fos 양성세포수는 정상군에 비해서 대조군 및 처치군에서 다소 증가되었으나 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었다. 척수 심층후각에서는 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으나, 처치군과 대조군간에는 유의성 있는 차이가 없었다. 중뇌 배측 및 복측중심관주위회백질에서는 대조군이 정상군에 비해서 모두 유의성 있게 증가되었다. 처치군은 대조군에 비해서 배측중심관주위회백질에서는 유의성 있게 감소되었으며(Fig. 3-8 & 3-9), 복측중심관주위회백질에서는 유의성 있는 차이는 없었다. 치상회에서는 대조군 및 처치군이 모두 정상군에 비해서 증가되었으나 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었다.

뇌실주위시상핵에서는 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3-10 & 3-11).

**Table 3. Effects of GCP Treatment on the Number of C-fos positive Neurons in Central Nerve System of Monosodium Idoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Pain in Rats**

Group	Spinal Cord		Mid Brain		DG	PVN
	SDH	DDH	DPAG	VPAG		
Normal(n=8)	17±8 <sup>a)</sup>	24±10	54±23	79±45	65±20	55±23
Control(n=8)	25±10	36±13*	78±13*	130±32*	83±22	88±27*
Treated(n=8)	21±4	29±6	57±16 <sup>#</sup>	99±41	80±19	60±15 <sup>#</sup>

<sup>a)</sup> : data expressed as Mean±S.D. SDH : superficial dorsal horn, DDH : deep dorsal horn, DPAG & VPAG : dorsal & ventral periaqueductal gray matter, DG : dentate gyrus, PVN : paraventricular thalamic nucleus. Normal : saline injected and treated with saline. Control : MIAinjected and treated with distilled water. Treated : MIA injected and treated with GCP. \* : Statistically significant compared with normal group(\*p<0.05). # : Statistically significant compared with control group(#p<0.05)



**Fig. 3. Microphotograph of c-fos expression of control group(8):** Many neurons (arrows) in dorsal periaqueductal gray matter(inside the lines) positively reacted with anti-c-fos. **Microphotograph of c-fos expression of treated group(9):** The numbers of c-fos positive neurons (arrows) in dorsal periaqueductal gray matter were decreased. Compare with control group(8). **Microphotograph of c-fos expression of control group(10):** Many neurons (arrows) in paraventricular thalamic nucleus(inside the lines) positively reacted with anti-c-fos. **Microphotograph of c-fos expression of treated group(11):** The numbers of c-fos positive neurons (arrows) in in paraventricular thalamic nucleus were decreased. Compare with control group(10). C-fos immunohistochemistry, ad:cerebral aqueduct. v : third ventricle. bar = 100  $\mu$ m.

4. Serotonin 양성 세포수의 변화

Serotonin 양성 세포수는 Table 4와 같다.

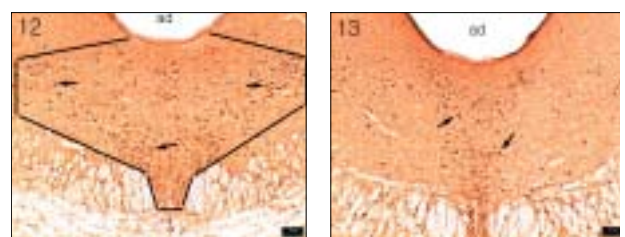
중뇌 배측술기핵에서의 serotonin 양성 세포수는 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4-12 & 4-13).

정중술기핵에서는 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성 있는 차이는 없었다.

**Table 4. Effects of GCP Treatment on the Number of Serotonin positive Neurons in Dorsal and Median Raphe nucleus of Monosodium Idoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Pain in Rats**

Group	Dorsal Raphe Nucleus	Median Raphe Nucleus
Normal(n=8)	144±44 <sup>a)</sup>	68±10
Control(n=8)	217±48**	139±34***
Treated(n=8)	171±31* <sup>#</sup>	112±16***

<sup>a)</sup> : data expressed as Mean±S.D. Normal : saline injected and treated with saline. Control : MIAinjected and treated with distilled water. Treated : MIA injected and treated with GCP. \* : Statistically significant compared with normal group(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). # : Statistically significant compared with control group(#p<0.05)



**Fig. 4. Microphotograph of serotonin expression of control group(12):** Many neurons (arrows) in dorsal raphe nucleus(inside the lines) positively reacted with anti-serotonin. **Microphotograph of serotonin expression of treated group(13):** The numbers of serotonin positive neurons (arrows) in dorsal raphe nucleus were decreased. Compare with control group(12). Serotonin immunohistochemistry, ad : cerebral aqueduct. bar = 100  $\mu$ m.

5. Substance-P 양성 반응의 변화

리사우어로 및 천층후각에서의 substance-P 양성반응 정도는 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5-14 & 5-15, Table 5).

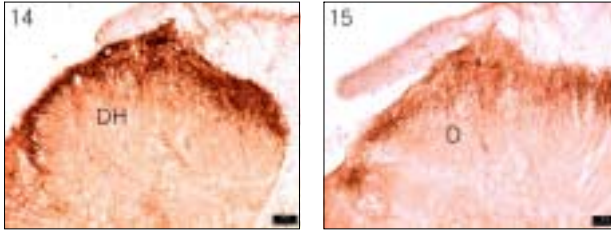


Fig. 5. Microphotograph of substance-P expression of control group(14): The superficial layer of dorsal horn(DH) deeply stained with anti-substance-P. Microphotograph of substance-P expression of treated group(15): The superficial layer of dorsal horn(DH) deeply stained with anti-substance-P. But the intensity of the staining lesser than control group. Compared with control group(12). Substance-P immunohisto- chemistry, bar = 30  $\mu$ m.

Table 5. Effects of Gamisoyeoum-Tang Treatment on the Density of Substance-P positive Reaction in Lissaur's Tract and Superficial Dorsal Horn of Monosodium Idoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Pain in Rats

Group	Lissaur's Tract and Superficial Dorsal Horn(%)
Normal(n=8)	100±9 <sup>a</sup>
Control(n=8)	119±11**
Treated(n=8)	97±7###

<sup>a</sup> : data expressed as Mean±S.D. Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIAinjected and treated with distilled water, Treated : MIA injected and treated with GCP, \* : Statistically significant compared with normal group(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001), # : Statistically significant compared with control group(###p<0.001)

고찰

골관절염은 연골을 침범하는 가장 흔한 관절염으로 65세 이상 노인의 만성장애 원인 중 가장 흔한 요인으로, 최근 급격히 진행되고 있는 우리 사회의 노령화에 따라 골관절염에 대한 관심은 그 중요성이 점점 더 확대되고 있다<sup>1,2</sup>.

최근에는 골관절염의 병인에 대한 연구가 진행되면서 골관절염은 이제 관절의 분해활성이 증가됨으로써 연골의 구조적 손상과 기능소실이 발생하는 활성, 진행성 질병과정이란 인식이 보편화되고 있다<sup>7,8</sup>. 따라서 골관절염의 치료목적도 이전의 단순한 통증조절에서 벗어나 먼저, 급만성 손상 후 발생하는 관절연골의 손상을 차단하고, 둘째, 정상적인 연골과 관절의 항상성을 회복시켜, 관절염 또는 전관절염의 추가적인 질병으로의 진행을 정지시키고, 셋째, 기존 관절연골의 손상을 복원해 정상적인 관절구조와 기능을 회복시키는 보다 적극적인 치료과정으로 변화되고 있다<sup>13,26</sup>. 요약하면 약리적 요법의 목표는 염증성 통증 및 신경인성 통증에 대한 직간접적인 통증제어에서, 골관절염으로 유발되거나 혹은 골관절염을 유발시키는 구조적 손상과 변화를 원상태로 회복시키는 방향으로 전환되고 있다.

이와같은 치료목적의 변화는 한의학에서 골관절염을 바라보는 관점과 유사하다. 각종 관절염과 근육과 골격에 통증을 나타내는 질환군을 포함하는 痺病證은 그 원인으로 風寒濕熱의 邪氣

가 외부로부터 유입된 것을 지적하지만, 더 근본적으로는 正氣가 허약하고 榮衛가 잘 조절되지 않는 등 정상적 건강상태의 파괴가 사기의 유입을 조래한 것으로 이해한다. 따라서 치료에 있어서도 祛風, 散寒, 除濕, 清熱 등 효능을 가진 처방과 약물들이 초기와 발작기에 선용되는데 이는 염증성 통증에 대한 처치와 유사점이 많다. 祛邪를 목표로 하는 치료법과 함께 좀더 근본적 치료에 접근하기 위해서 榮衛를 調節하고 氣血을 營養하며 肝腎을 補益하는 법을 병행하는데 이는 靜止期와 만성화, 고령화된 환자군에게 더욱 강조되는 부분이다<sup>1</sup>. 특히 '補肝腎·強筋骨'의 처방은 관절내 구조적 손상과 변화를 회복시키는 작용에 좀더 근접한 것으로, 이는 근육과 인대 등은 肝의 분류에 속하고, 골·관절·관절액 등은 腎의 분류에 속하는 오행이론에 근거한 치료법이다. 한약의 효능 중 肝과 腎을 補益하는 기능을 가진 약물들이 모두 관절관련 질환에 대한 효과가 있다고 보는 것은 무리이지만, 強筋骨·舒筋活絡·祛風濕 등의 효능과 함께 肝腎을 補益하는 효능이 있거나, 肝經과 腎經으로 歸經하는 약물들은 관절의 구조적 회복에도 영향을 줄수 있을 것으로 추측할수 있다<sup>10</sup>.

본 연구에서 사용된 진교, 위령선, 하고초 복합방은 풍습을 제거하고 清熱하는 효능과 함께 국소 순환개선을 통한 진통효과와 근육, 인대 등 결합조직을 이완시키는 효과를 함께 가지고 있는 약물들로, 오래전부터 단일 약물 혹은 복합처방 속에 가미하여 골관절염에 사용되어 왔다. 하고초는 관절질환 뿐 아니라 각종 질환에서 기질적 변화를 일으킨 경우에 消腫散結의 효능을 위해 활용할수 있고, 위령선은 痺病證을 치료하는 약물중 風寒濕 外邪를 치료하는데 藥槩으로 분류되는 약물이다. 진교는 외부의 邪氣를 흩어지게 하는 효능과 함께 관절을 부드럽고 강하게 補潤해서, 補肝腎·強筋骨과 유사한 효능을 겸하고 있는 한약제이다<sup>4,5</sup>.

실험적 연구에 의하면 진교, 위령선, 하고초는 단일 약제로써 통증전달과 관련하여 중뇌수도관 회백질 영역에서 Nitric oxide synthase(NOS)를 유의성있게 억제하였고, 관절연골의 proteoglycan 변성을 억제하는 작용이 있었다<sup>11-16</sup>. 진교·위령선·하고초는 이와같은 실험 결과에 기초하여 진교·위령선·하고초(GCP) 복합방을 이용한 실험이 이어졌는데, GCP 복합방은 흰쥐의 MIA 유발 골관절염의 병리발생에서 연골세포 및 활막세포의 IL-1 $\beta$  및 COX-2의 분비를 억제시켜 연골의 변성을 막음으로써 골관절염의 진행을 억제시키는 효과가 있었다<sup>10</sup>. 이는 골관절염에 대한 비교적 근본적 치료목표인 관절강내 활액 및 연골세포의 분해 억제, 합성 촉진 등에 근접한 결과이다<sup>26</sup>.

이에 저자는 GCP 복합방의 임상적 활용도를 높이기 위해, 이미 확인된 관절강 내의 병리상태를 개선시키는 효과와 함께, 골관절염으로 인해 유발된 통증에 대한 제어효과 여부를 확인하고자 본 실험을 진행하였다. 중뇌수도관 회백질 영역의 NOS 감소 효과가 개별적으로 확인된 진교, 위령선, 하고초가 복합방에서도 유효한지를 추가 실험하였고, 그 외에 말초자극으로부터 중추로의 통증전달 과정에 관여하는 C-fos, serotonin, substance-P의 변화에 대해서도 함께 실험하였다.

실험방법은 monosodium idoacetate(MIA) 0.5 mg을 양측 슬관절강내 주입한 대조군, MIA 주입과 함께 GCP 농축액을 20일

간 경구투여한 처치군으로 분류하고 실험종료일에 뇌 및 척수를 적출하여 NADPH-d 조직화학 및 C-fos, serotonin 및 substance-P에 대한 면역조직화학을 실시하였다.

MIA 주입 관절염 모델은 연골 연화를 초래하여 간단하고 빠르게 인간의 퇴행성 관절염과 유사한 연골의 궤양과 fibrillation, 활액막 반응 등의 조직학적 변화를 유발하는 관절염 모델이다<sup>35)</sup>.

NO(nitric oxide)는 중추신경계와 말초신경계에서 시냅스간 신호를 전송하는 신경전달자이다. NO는 NOS의 작용을 통해 아미노산 L-arginine으로부터 형성되며, NOS의 일종인 nNOS(neural NOS)는 척수 후각의 표층에 주로 집중되어 있다<sup>27,28)</sup>. 실험적 연구에 의하면 말초의 화학적 자극이 가해지면 척수에서 NO의 유리가 증가되고 nNOS 양성반응 신경세포의 수가 요척수 후각에서 크게 증가한다<sup>9,18)</sup>. 본 연구에서 대조군은 척수 및 배외측중뇌수도관주위회백질에서 정상군에 비해 NADPH-d 양성세포수가 유의성 있게 증가되어(Table 2), NO가 MIA 유발 골관절염에서의 통각전달에 관여함을 알 수 있었다. 또한 척수의 천층후각과 배외측중뇌수도관주위회백질에서 NADPH-d 양성세포수가 처치군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 보아(Table 2), GCP 투여가 NOS 활성을 감소시켜 통각전달에 영향을 주었을 것으로 판단된다.

Fos 단백질의 발현이 유도되는 것을 면역조직화학 방법으로 확인할 수 있으며, Fos 단백질에 대한 면역반응은 말초신경이 활성화된 후 척수신경세포의 연결을 통한 신경세포의 활동성에 대한 표지자로 오랫동안 이용되었다<sup>20,30)</sup>. 본 연구에서 대조군은 척수의 심층후각, 중뇌의 배측 및 복측중뇌수도관주위회백질, 그리고 뇌실강주위시상핵에서 정상군에 비해 C-fos 양성세포수가 유의성 있게 증가되어(Table 3), MIA 유발 골관절염에서 이들 부위가 C-fos의 활성화를 통해 통증 전달 경로로 이용되었음을 알 수 있었다. GCP 투여군에서 배측중뇌수도관주위회백질의 C-fos 양성세포수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었는데(Table 3), 이는 GCP 투여가 척수로를 통한 통증 전달과정을 일정부분 억제할 것으로 보인다.

Serotonin은 뇌간에서의 통각정보 처리에 있어서 일정 역할을 하는데, 뇌간에 전달된 통각정보는 광역조절계(diffuse modulatory system)에 전달되어 각성반응, 자율신경 반응, 심폐기능의 변화 외에 뇌간에 있는 내재진통계(endogenous analgesic system)를 활성화 시킨다. 내재진통계는 수로주변회백질(PAG)과 대솔기핵(mucleus raphe magnus)을 통해 척수로 연결되는 축이 중요한 역할을 하며 opioid와 serotonin이 전달물질로 생각된다<sup>21,31)</sup>. 쥐의 통증모델에서도 serotonin은 배측솔기핵과 정중솔기핵에서 통증전달에 관여하는 것으로 확인되었다<sup>32,33)</sup>. 본 연구에서도 대조군의 배측 및 정중솔기핵에서 정상군에 비해 serotonin 양성세포수가 유의성 있게 증가되어(Table 4), 척수후각에 전달된 통증 정보들이 하행성 및 중간억제 신경세포들의 활동에 의하여 시냅스 흥분의 전달이 조절된 것으로 보인다. 반면 GCP 처치군에서 중뇌 배측솔기핵의 serotonin 양성세포수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였는데, 이는 내재진통계의 활성화가 억제된 것으로 상부 중추로 전달되는 통각정보가 대조군

에 비해서 줄어들었기 때문이라고 생각된다.

Substance P는 외부의 자극을 척수로 운반하는 일차 구심성 신경섬유를 자극하였을 때 신경말단에서 분비하여 척수후근 신경절에서는 20% 정도가 substance P에 대한 면역반응성을 보인다고 보고되었는데, 이러한 신경섬유들은 척수후근으로 입력되어 리사우어로(Lissauer tract)를 통해 lamina I, II에 연결되거나, 더 깊게는 lamina V에서 척수후각신경세포에 연결된다<sup>22,23)</sup>.

본 연구에서 대조군은 정상군에 비해 리사우어로 및 천층후각에서 substance P 양성반응 정도가 유의성 있게 증가되어(Table 5), MIA 유발 골관절염에서 척수를 통한 상행성 통증전달 경로상 일차 구심신경으로부터 유리되는 신경전달물질로 substance P가 이용되었음을 확인하였다. 반면 GCP 처치군에서 substance-P 양성 반응이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되어, GCP 복합방은 substance P 활성화와 관련된 1차 감각경로에 영향을 미치는 것으로 보인다.

연구결과에 따르면 C-fos 발현에 NO가 중계 역할을 담당하고 있고, 아울러 nitric oxide가 척수에서 말초의 유해성 자극을 척수시상로를 통해 중추로 전달하는 역할을 할 가능성이 제기되었는데<sup>24,34)</sup>, 본 실험에서도 NOS, C-fos가 대조군에서 동일하게 증가하고, GCP 투여군에서 동일하게 감소하여 같은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 척수로를 통한 상행성 통증전달 과정에서 NOS, C-fos가 이용되는 척수시상로의 통증 전달 과정이 제어되었을 가능성도 있지만, MIA로 유발된 관절염에 대한 치료효과<sup>10)</sup>로 국소 통증의 총량적 감소가 발생했을 가능성도 제외할 수 없다. 척수후근으로 연결되는 일차 구심성 신경섬유로부터 유리되는 Substance P가 대조군에 비해 유의성 있는 감소된 결과를 보더라도, 강한 통증성 자극에 반응하는 Substance P의 감소는 척수수로 유입된 통증신호의 강도가 약화되었다는 것을 시사하고, 하행성 진통작용을 나타내는 Serotonin이 GCP 투여군에서 증가되지 않고 오히려 감소된 것은 척수로를 통해 중추로 전제되는 통증의 크기가 대조군에 비해 GCP투여군에서 감소하였을 가능성을 나타내 때문이다. MIA로 유발된 골관절염 모델을 통한 실험으로는 국소 염증성 통증에 대한 치료효과와 통증전달 과정에 대한 억제기전을 구별하여 효과를 검증하는데 제한이 있으므로 향후 신경병증성 통증을 유발한 통증모델에서 GCP 복합방에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

진교 · 위령선 · 하고초 복합방 (GCP)이 monosodium idoacetate (MIA)로 유발된 흰쥐의 골관절염 통증에 미치는 영향을 확인하기 위해서 MIA 0.5 mg을 양측 슬관절강내 주입한 대조군, MIA 주입과 함께 GCP 농축액을 20일간 경구투여한 처치군으로 분류하고 실험종료일에 뇌 및 척수를 적출하여 NADPH-d 조직화학 및 c-fos, serotonin 및 substance-P에 대한 면역조직화학을 실시하였다.

NADPH-d 양성세포 수는 척수의 천층후각에서 처치군(21±5)이 대조군(33±5)에 비해서 유의성(p<0.001) 있게 감소되었

으며, 배외측중심관주위회백질에서는 처치군(111±16)이 대조군(143±14)에 비해서 유의성(p<0.01) 있게 감소되었다.

C-fos 양성세포 수는 배측중심관주위회백질에서 처치군(57±16)이 대조군(78±13)에 비해서 유의성(p<0.05) 있게 감소되었고, 뇌실주위시상핵에서는 처치군(60±15)이 대조군(88±27)에 비해서 유의성(p<0.05) 있게 감소되었다.

Serotonin 양성세포 수는 배측출기핵에서 처치군(171±31)이 대조군(217±48)에 비해서 유의성(p<0.05) 있게 감소되었다.

Substance-P 양성 반응(%)은 척수의 Lissaur's tract 및 천층 후각에서 처치군(97±7)이 대조군(119±11)에 비해서 유의성(p<0.001) 있게 감소되었다.

이상의 성적을 토대로 할 때 진교·위령선·하고초 복합방은 MIA로 유도된 흰쥐의 골관절염에서 통증의 전달을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 한방재활의과학회. 한방재활의학. 서울, 군자출판사, pp 79-97, 2006.
2. 김진호, 한태륜. 재활의학. 서울, 군자출판사, pp 501-524, 2006.
3. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울, 최신의학사, pp 195-201, 2005.
4. 김규열. 本草濼編. 제천, 세명대학교 한의과대학, pp 59-61, 156-160, 1999.
5. 전국한외과대학. 本草學. 서울, 영림사, pp 264-265, 1994.
6. 대한병리학회. 병리학 제5판. 서울, 고문사, pp 58-59, 2003.
7. 해리슨 내과학 편찬위원회 편. 내과학. 서울, 정담, pp 821-827, 1997.
8. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 1167-1169, 2003.
9. 박동수. 붕독약침이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염 통증 모델에서 중추신경내 NOS, C-fos, Serotonin, Substance P 발현에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2007.
10. 이승현. 진교·위령선·하고초 복합방이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2007.
11. 반사평. 진교가 관절강내 Collagenase 투여로 인한 관절연골의 Proteoglycan 변성에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2005.
12. 류헌식. 하고초가 흰쥐의 관절강내 Collagenase 투여로 인한 관절연골의 Proteoglycan 변성에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2006.
13. 이동열. 위령선이 흰쥐의 관절강내 Collagenase 투여로 인한 관절연골의 Proteoglycan 변성에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2005.
14. 양국정. 위령선이 콜라겐으로 유발된 관절염에 걸린 쥐의 Periaqueductal Gray 영역에서 NOS(Nitric Oxide Synthase)에 미치는 영향. 세명대 대학원, 2005.
15. 신원수. 하고초가 콜라겐으로 유발된 관절염에 걸린 쥐의 중뇌수도관 회백질 영역에서 NOS(Nitric Oxide Synthase)에

미치는 영향. 세명대학교 대학원, 2005.

16. 김현수. 진범이 콜라겐으로 유도된 관절염에 걸린 쥐 모델의 중뇌수도관 영역에서 Nitric Oxide Synthase에 미치는 영향. 세명대학교 대학원, 2005.
17. 김미정. 퇴행성 관절염의 통증치료기법 및 최신 약물요법 소개. 대한임상노인의학회 추계학술대회, pp 380-384, 2005.
18. 한설희. 백서 뇌에서의 Nitric Oxide Synthase를 함유한 신경세포의 분포에 관한 연구. 충북의대학술지 6(1):13-20, 1996.
19. 황승준, 이종환, 정태진. Freund's complete adjuvant로 유도된 염증성 통증 모델 쥐 뒤뿌리신경절에서 nitric oxide의 변화. 대한해부학회지 33(2):135-142, 2000.
20. 강 구, 최기용, 이민섭. 이질통증의 발생에 대한 Minochlyline의 완화효과. 대한병리학회지 38: 311-318, 2004.
21. 김 전. 통증의 신경생리. 대한신경과학회 춘계보수교육, 1: 5-9, 2000.
22. 조해룡, 한희철, 남숙현. Substance P가 통각유발물질에 의해 유발된 척수굴근반사에 미치는 영향. 24(3):75-84, 1987.
23. 김우경, 김희진, 남택상. 신경병증성 통증을 유발한 흰쥐에서 손상부위에 따른 신경전달물질 변동. 대한근전도·전기진단학회지 2(1):55-64, 2000.
24. 김재효, 구성태, 손인철. 白鼠의 formalin 유발 통증에 대한 전침자극과 하행성 진통기전. 대한경락경혈학회지 23(3):55-71, 2006.
25. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. Arthritis & Rheumatism 43(9):1905-1915, 2000.
26. Baker, C.L., Jr., Ferguson, C.M. Future treatment of osteoarthritis. Orthopedics 28: 227-234, 2005.
27. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M., Noncada, S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. Biochem J. 269: 207-210, 1990.
28. Vincent, S.R., Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience. 46(4):755-784, 1992.
29. Bicker, G. NO news from insect brain. Trends neurosci. 21: 349-355, 1998.
30. Greenberg, M.E., Greene, L.A., Ziff, E.B. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. J Biol Chem 206(26):14101-14110, 1985.
31. Basbaum, A.I., Fields, H.L. Endogenous pain control mechanism-review and hypothesis. Ann Rev Neurosci. 7: 309-338, 1984.
32. Palazzo, E., Genovese, R., Mariani, L., Siniscalco, D., Marabese, I., De Novellis, V., Rossi, F., Maione, S. Metabotropic glutamate receptor 5 and dorsal raphe serotonin release in inflammatory pain in rat. Eur J

- Pharmacol. 492(2-3):169-176, 2004.
33. Rioja, J., Santin, L.J., Dona, A., de Pablos, L., Minano, F.J., Gonzalez-Baron, S., Aguirre, J.A. 5-HT1A receptor activation counteracts c-Fos immunoreactivity induced in serotonin neurons of the raphe nuclei after immobilization stress in the male rat. *Neurosci Lett.* 397(3):190-195, 2006.
34. Wu, J., Fang, L., Lin, Q., Willis, W.D. Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience.* 96(2):351-357, 2000.
35. Rachel Combe, Steve Bramwell, Mark J. Field. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. *Neuroscience Letters.* 370: 236-240, 2004.
36. Janusz, M.J., Hookfin, E.B., Heitmeyer, S.A., Woessner, J.F., Freemont, A.J., Hoyland, J.A., Brown, K.K., Hsieh, L.C., Almstead, N.G., De, B., Natchus, M.G., Pikul, S., Taiwo, Y.O. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis and Cartilage.* 9(8):751-760, 2001.