Papain으로 유도된 골관절염 생쥐 모델에서 四逆湯의 항골관절염 효능에 관한 연구

공상은 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 재활의학과교실

Effects of Sayeok-tang on Papain-Induced Osteoarthritis in Mice

Shyang En Kung, Min Seok Oh*

Department of Korean Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

This study intends to clarify how *Sayeok-tang*(here in after reffered to SYT) affect C57BL/10 mice whose osteoarthritis was induced by papain. Osteoarthritis was induced by injecting papain in the knee joint of 3 groups(n=6) of mice. Normal group was non-treatment group and was not injected papain, whereas control mice were orally administered with 200 ㎕ of physiological saline. Positive comparison group was medicated with 100 mg/kg of Joins® mixed with 200 ㎕ of physiological saline. Experimental group was medicated with 400 mg/kg of SYT mixed with 200 ㎕ of physiological saline. Both Positive and experimental comparison groups were orally medicated once per day for 4 weeks. After the experiment, the functions of liver and kidney, inflammation cytokine values within serum, degree of revelation for inflammation cytokine genes, immune cells within blood, metabolism of arachidonic acid and amount of cartilage were measured and histopathological changes in the knee joint structures were observed. As results, SYT had no significant effect on the liver and kidney functions. Interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), monocyte chemo attractant protein-1(MCP-1) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) were significantly decreased. Inflammation cytokines in joints were all significantly decreased. Prostaglandin E_2(PGE_2), thromboxane B_2(TXB_2) were significantly decreased. Destruction of cartilage on micro computed tomography(CT)-arthrography was meaningfully decreased. In terms of histopathology, infiltration of inflammation, proliferation of synovial membrane, subsidence of cartilage and bone due to penetration of excessive formation of synovial cell and destruction of cartilage were small. Based on all results mentioned above, *Sayeok-tang*(SYT) is believed to be meaningful for suppressing the progress of osteoarthritis and its treatments because of its anti-inflammatory effects and alleviation of pain with histopathological effective efficacy.

Key words : *Sayeok-tang*(SYT), Osteoarthritis, Papain-induced osteoarthritis, Cytokine, mRNA, Arachidonic acid

서 론

골관절염(osteoarthritis)은 관절연골의 파괴와 연골하 골조직의 재형성을 특징으로 하는 관절질환으로 반복적인 동통, 관절강직감 및 점진적인 운동장애 등을 초래한다[1,2].

2011년 통계청 조사에서 우리나라 65세 이상 고령인구는 2010년 545만 명으로 16개 시·도 전체가 고령화 사회로 진입하였고, 2030년에는 2.3배, 2060년에 3.3배 증가하는 것으로 나타나[3] 고령 인구의 증가에 따른 골관절염 질환에 대한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

골관절염의 가장 흔한 증상은 국소관절의 통증이며, 활동시 심해지는 양상을 보이다가 병의 경과가 심해지면 지속형으로 나타난다. 또한, 더 진행되면 관절액 증가로 인한 부종, 관절의 운동장애, 관절 주위 압통, 다른 부위로의 연관통, 보행 장애 등을 보이기도 한다[4].

골관절염의 서양의학적인 보존적 치료로 NSAIDS 등의 진통소염제, 글루코사민 등의 건강보조식품 등이 사용되고 있으나, NSAIDS는 위점막 손상, 속쓰림, 위출혈 등의 합병증 발현으로 장기복용이 어려우며[5], 글루코사민은 골관절염 환자에서의 임상

* 교신저자 : 오민석, 대전시 서구 둔산2동 대전대학교 둔산한방병원

· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 042-470-9136

· 접수 : 2012/12/14 · 수정 : 2013/02/19 · 채택 : 2013/02/23

적 효과가 부족한 것으로 보고되고 있고[6], 수술적 치료로는 자가 골연골 이식술과 미세천공술 등이 시행되고 있으나 골연골 이식술은 결손부위의 위치와 크기에 제한이 있다는 단점이 있고 미세천공술은 재생된 연골조직이 지속적인 체중부하에 생역학적 변화를 일으키지 않고 얼마나 유지할 수 있는지에 대한 논란이 계속되고 있어 골관절염의 치료제 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다[7,8].

한의학에서 골관절염은 인체의 正氣가 不足한 상태에서 風寒濕 邪氣가 경락으로 침입하거나 관절에 응체되어 肌肉, 筋骨, 關節에 痲木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利 및 관절의 강직성 변형을 초래하는 痺病의 범주에 포함시켜 연구되어 왔다[1].

최근 한의학에서는 활락단을 이용한 adjuvant 유발 관절염 진행 억제 효과연구와 蠲痺湯, 附子湯, 疎風活血湯, 秦艽·威靈仙·夏枯草 복합방이 monosodium iodoacetate로 유발된 골관절염 동물모델에 투여하여 진통효과와 골관절염의 진행억제 효과를 입증한 동물 모델 실험 연구들이 발표되고 있다[9-13].

사역탕(Sayeok-tang, 이하 SYT)은 "治四肢厥逆 身體疼痛 下利淸穀, 或 小便淸利者"[14,15]라 하여 신진대사의 작용이 극도로 沈衰하여 있어 惡寒 發熱 下利 四肢와 신체의 拘攣 疼痛을 치료하는 처방[16]으로 고령인의 특성상 正氣가 不足하여 虛寒[1]해지기 쉬운 상태에 발병한 관절염에 적합할 것으로 생각하여 연구하게 되었다.

이에 저자는 골관절염에 대한 사역탕의 효과를 실험적으로 규명하고자, papain으로 유발된 골관절염 실험용 생쥐 모델을 이용해서 혈청 내 염증 cytokine에 미치는 영향, arachidonic acid의 대사 작용에 미치는 영향, 혈액 내 면역세포에 미치는 영향, 염증인자의 유전자 발현에 미치는 영향, 연골 및 활막의 병리조직학적 변화에 미치는 영향 등을 측정한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 四逆湯(Sayeok-tang, 이하 SYT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 처방중량은 『古方類聚』[14]에 나와 있는 처방용량을 기준으로 사용하였다. 시료 추출은 흡수율을 높이기 위해 약재를 분말한 후 분말 50 g에 80% 에탄올 500 ml을 가한 후 환류추출장치를 이용하여 60℃에서 1시간 동안 추출한 후 3M 여과지로 여과하고 감압증류기를 이용하여 에탄올을 제거한 후 동결건조기를 이용하여 건조한 다음 분말하여 사용하였다(Table 1).

2) 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$,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, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, IL-1β, MCP-1, IL-6, TNF-α, prostaglandin E_2, leukotriene B_4 ELISA kit는 BioSource 사(California, USA), Thromboxane B_2, COX-2, iNOS-Ⅱ(R&D Co., USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO_2 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(Shimazue, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time RT-PCR(Applied Biosystems, USA), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, USA), MS9-5(melet schloesing, France), plate shaker(Lab-Line, USA), 및 ELISA leader(Molecular Devices, USA), micro CT arthrography (SkyScan 1076; SkyScan, Aartselaar, Belgium), 자동혈구측정기 (MS9-5, melet schloesing, France) 등을 사용하였다.

4) 동물

암컷 6 주령의 C57BL/10 (약 22 g)는 중앙실험동물(Seoul, Korea)을 통하여 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. 본 연구는 대전대학교 동물 실험연구위원회의 승인 (DJUARB2010-045)을 받아 진행되었다.

Table 1. The Compositions of *Sayeok-tang*(SYT)

Name of herb	Pharmacognostic name	Amount(g)
甘 草	*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*	6
乾 薑	*Zingiberis Rhizoma*	4.5
附 子	*Aconiti Lateralis Radix Preparata*	3
	Total amount	13.5

2. 방법

1) 시험 방법

(1) Papain투여에 의한 골관절염 유발 동물모델

단백분해물질인 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 생리식염수로 조정하여 papain이 활성화되도록 0.03 M L-cystein HCl(Sigma, USA)을 보충한 다음 슬개골 인대를 통과하여 우측 무릎관절에 이용액 6 ㎕를 투여하였다. Papain 용액은 투여 전 0.2 μm syringe filter를 통과시켜 박테리아를 제거하였다.

(2) 실험군 분류

실험은 정상군(Normal), 대조군(OAC-control), 양성대조군(OAC-Joins®), 실험군(OAC-SYT)으로 총 4군으로 분류하여 실험

하였으며, 정상군은 papain으로 골관절염을 유발하지 않고 아무런 처치 없이 자유식이 하였다. 나머지 3군은 C57BL/10 생쥐에 papain을 주사한 후 일주일(7일) 후부터 실험하였으며, 대조군은 아무런 처치를 하지 않고 자유식이 하였으며, 양성대조군은 조인스 정(Joins®, 100 mg/kg), 실험군은 SYT 400 mg/kg을 매일 오전 11시에 1일 1회 총 4주간 경구 투여하였다. 동물 수는 각 군당 6마리로 하였다(Table 2).

Table 2. Papain Injection and Treatment in Each Group

Group name	Papain injection	Treatment	Number of mice
Normal	×	×	6
OAC-control	○	×	6
OAC-Joins®	○	Joins®, 100 mg/kg	6
OAC-SYT	○	SYT 400 mg/kg	6

2) 염증 cytokine 및 인자 ELISA 측정

실험 종료 후 혈액 및 synovial fluid를 채취하였다. 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 분리한 뒤, 염증성 지표로서 IL-1β, TNF-α, IL-6 등의 cytokine은 ELISA로 측정하고, thromboxane B_2, prostaglandin E_2, leukotriene B_4, thromboxane B_2, COX-2, iNOS-Ⅱ 등의 염증성 매개인자들은 각각의 assay kit를 이용하여 농도를 측정하였다.

3) 혈액분석(Hematology)

최종 실험 종료 후 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 1.0 ㎖를 채혈하였다. 전혈을 바이오톡스텍(주)(청주, 충청북도)에 의뢰하여 백혈구 중 호중구, 단핵구의 총 세포수를 측정하였다. 혈구세포 수는 심장 천자법으로 채취한 혈액을 자동혈구측정기로 Fonio법에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

4) Quantitative real-time-PCR

(1) C57BL/10 생쥐의 무릎 관절 조직에서 RNA 분리

골관절염 유발 C57BL/10 생쥐의 무릎 관절 조직을 적출하여 각각에 RNAzolB 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 조직분쇄 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 ㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 ㎕와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 ㎍을 DNase I(10 U/㎕) 2 U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10 분 동안 변성시키고, 이에 2.5 ㎕ 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕ random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕ RNase inhibitor(20 U/㎕), 1 ㎕ 100 mM DTT, 4.5 ㎕ 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1 ㎕의 M-MLV RT(200 U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 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.

(3) Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였다. Mouse olionucleotide의 염기배열은 다음과 같다(Table 3).

Table 3. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
IL-1β	Forward	5′ CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 3′
	Reverse	5′ GATCCACACTCTCCAGCTGCA 3′
IL-6	Forward	5′ TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3′
	Reverse	5′ GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3′
TNF-α	Forward	5′ TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3′
	Reverse	5′ GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3′
COX-2	Forward	5′ TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3′
	Reverse	5′ TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3′
iNOS-II	Forward	5′ GGCAGCCTGTGAGACCTTTG 3′
	Reverse	5′ GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC 3′

Cytokine 유전자 발현은 SYBR® Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, iNOS-II의 mRNA 발현은 무릎 관절 조직에서 관찰하였고 cDNA를 합성하여 분석하였다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 min at 50℃, 10 min 94℃, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95℃, 1 min at 60℃에서 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.

5) Micro CT-arthrograpy 측정

Micro CT 측정은 조형제인 헥사브릭스(Heaxabrics 320)를 꼬리 정맥에 주사 후 micro CT-arthrograpy를 사용하여 무릎 관절의 연골파괴정도는 연골량(cartilage volume)을 측정 및 분석하여 평가하였다(Fig. 1).

6) 병리 조직학적 검사

Micro CT 촬영이 끝난 후 무릎 관절 부위를 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% formalin 용액에 넣어 decalcification시켰다. Radiographic technique를 이용하여 decalcification 유무를 확인한 후 parafin wax에 joint를 넣고 고정한 다음 coronal section을 실시하였다. Decalcification과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 ㎛의 크기로 자른 뒤, hematoxylin and

eosin(H&E) 및 safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증반응 발생 유무나 활막세포의 증식, 염증세포의 조직침윤 여부는 H&E 염색결과에서 확인할 수 있으며, proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색결과에서는 연골조직의 손상여부를 확인하였다.

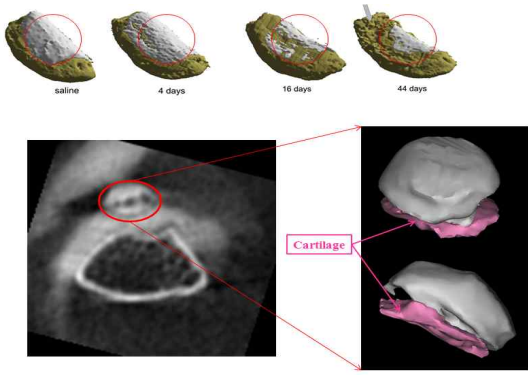

Fig. 1. Image of cartilage generation using micro CT-arthrography in the joint tissue of papain-induced mouse osteoarthritis.

3. 통계처리

대조군과 양성대조군, 실험군의 투여로 인한 변화된 측정치를 대조군에 대한 투여군의 백분율로 포시하거나, 평균과 표준오차 등 측정된 수치 및 오차를 근거로 Student's t-test 방법으로 통계프로그램(Excel. Microsoft Co., USA)을 이용하여 p값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 간기능에 미치는 영향

ALT(alanin aminotransferase)는 정상군 30.9±2.6, 대조군 26.9±2.7, 양성대조군 32.6±2.5, SYT 투여군에서 39.6±10.7(U/L)로 나타났다. AST(aspartate transaminase)는 정상군, 대조군, 양성대조군, SYT 투여군에서 각각 83.5±10.9, 100.4±10.5, 84.0±15.6, 116.5±23.8(U/L)로 나타났다(Fig. 2).

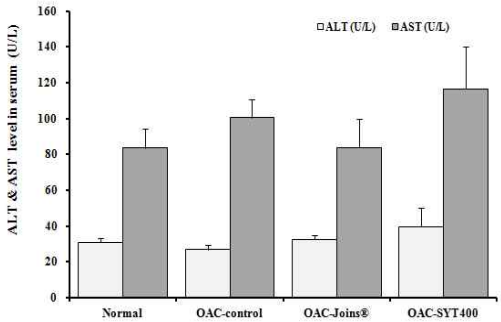

Fig. 2. Effect of SYT on the ALT and AST in papain-induced mouse osteoarthritis. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD.

2. 신장 기능에 미치는 영향

1) 혈청 BUN 농도

정상군 27.9±3.7, 대조군 29.9±1.9로 나타났으며, 양성대조군 31.4±2.2, SYT 투여군 26.5±3.2 mg/㎗로 나타나 SYT 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

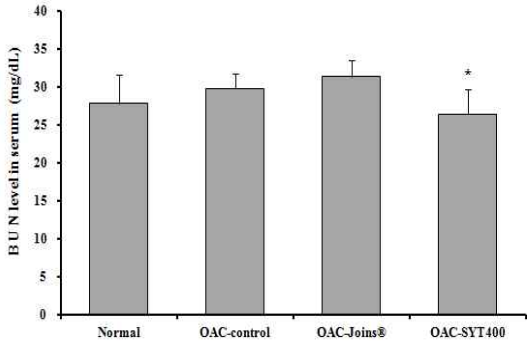

Fig. 3. Effect of SYT on the BUN in papain-induced mouse osteoarthritis. Normal ; C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(*$p<0.05$).

2) 혈청 Creatinine 농도

정상군 1.37±0.01, 대조군 0.41±0.02로 나타났으며, 양성대조군 0.41±0.02, SYT 투여군 0.38±0.04 mg/㎗로 나타났다(Fig. 4).

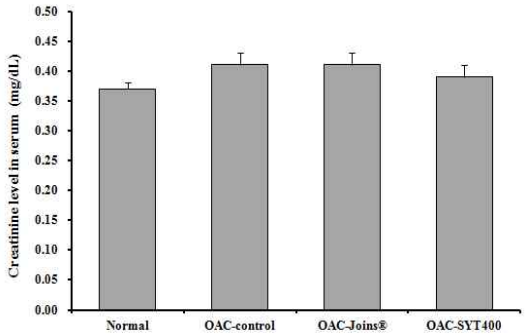

Fig. 4. Effect of SYT on the creatinine in papain-induced mouse osteoarthritis. Normal ; C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD.

3. 혈청 내 염증 cytokine에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량

정상군 6.9±2.1, 대조군 139.3±23.0, 양성대조군 15.6±3.6, SYT 투여군 85.5±13.3 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT 투여군에서 대조군에 비하여 각각 유의성($p<0.001$, $p<0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5).

2) IL-6 생성량

정상군 58.4±15.0, 대조군 1002.4±256.2, 양성대조군 145.0±57.5,

SYT 투여군 544.1±64.7 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.01, p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).

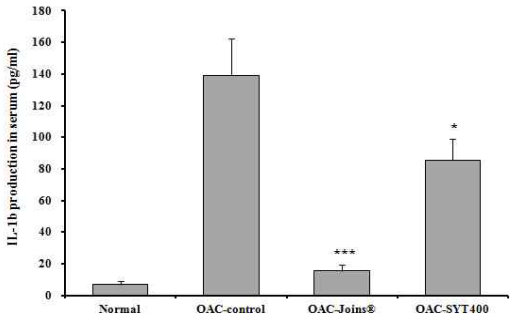

Fig. 5. Effects of SYT on levels of IL-1β in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control by T test(***p<0.001, *p<0.05).

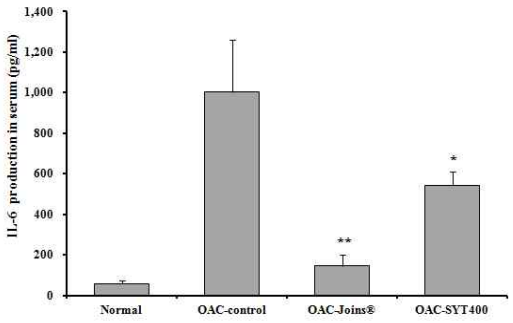

Fig. 6. Effects of SYT on levels of IL-6 in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control by T test(*p<0.05, **p<0.01).

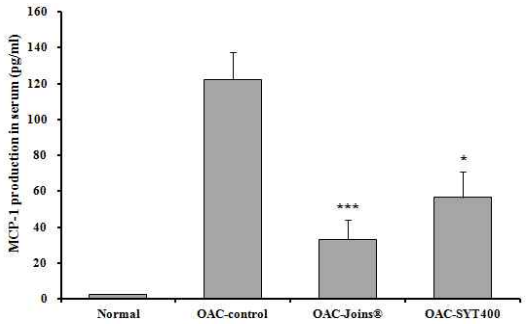

Fig. 7. Effects of SYT on levels of MCP-1 in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(*p<0.05, ***p<0.001).

3) MCP-1 생성량

정상군 2.5±0.4, 대조군이 122.4±15.2, 양성대조군이 33.4±11.0, SYT 투여군이 56.6±14.1 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.001, p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

4) TNF-α 생성량

정상군 10.6±1.9, 대조군 142.4±19.1, 양성대조군 38.4±8.0, SYT 투여군 50.8±6.7 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

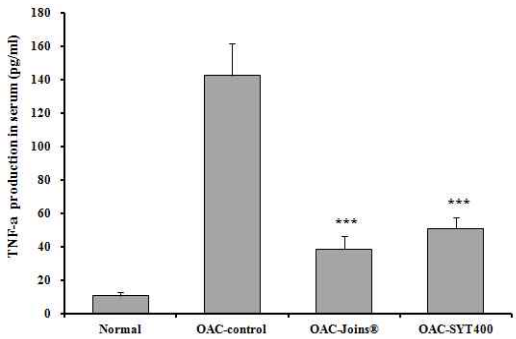

Fig. 8. Effects of SYT on levels of TNF-α in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT 400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

4. Thromboxane B_2에 미치는 영향

정상군 17.3±4.1, 대조군 49.2±14.2, 양성대조군 14.2±1.8 pg/㎖, SYT 투여군 27.6±4.9 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 유의성(p<0.001, p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 9).

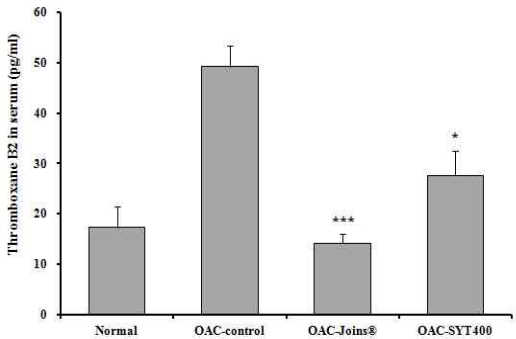

Fig. 9. Effects of SYT on levels of thromboxane B_2 in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(*p<0.05, ***p<0.001).

5. Leukotriene B_4 생성에 미치는 영향

정상군 50.1±7.9, 대조군 314.5±46.9, 양성대조군 91.0±19.1, SYT 투여군 235.2±30.9 pg/㎖로 나타나 양성대조군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었고, SYT투여군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

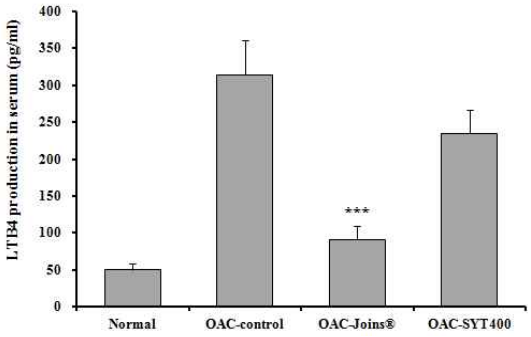

Fig. 10. Effects of SYT on levels of Leukotriene B_4 in the serum of papain- induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

6. Prostaglandin E_2 생성에 미치는 영향

정상군 59.2±0.7, 대조군 271.0±20.8, 양성대조군 123.2±42.4, SYT 투여군이 108.6±22.4 pg/㎖로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.01, p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 11).

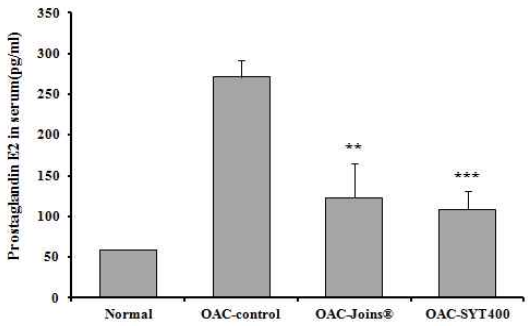

Fig. 11. Effects of SYT on levels of Prostaglandin E_2 in the serum of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(**p<0.01, ***p<0.001).

7. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

1) 백혈구 량

정상군 9.03±0.04, 대조군 8.43±0.49, 양성대조군 8.84±0.29, SYT 투여군이 7.76±0.73 (×10^3/㎖)로 나타나 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 12).

2) 중성구 (Neutrophils) 비율

정상군 5.9±0.15, 대조군 22.1±4.12, 양성대조군 6.9±0.82, SYT 투여군 16.7±1.62 (%)로 나타나 양성대조군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01) 있는 감소를 나타내었고, SYT투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 13).

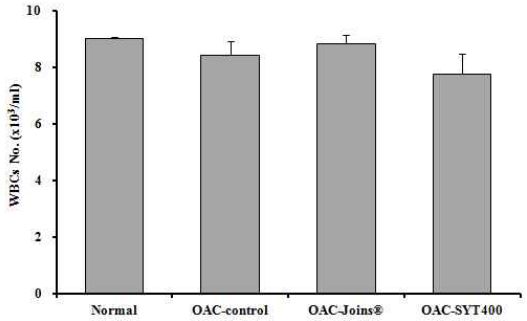

Fig. 12. Effects of SYT on levels of white blood cells in the blood of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD.

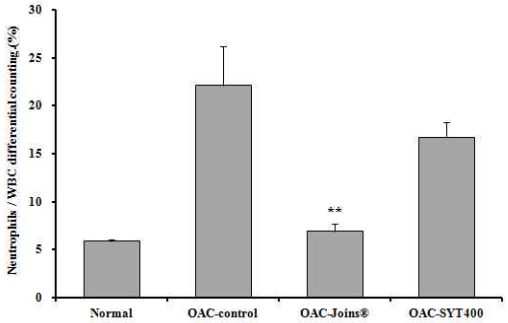

Fig. 13. Effects of SYT on levels of neutrophils in the blood of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(**p<0.01).

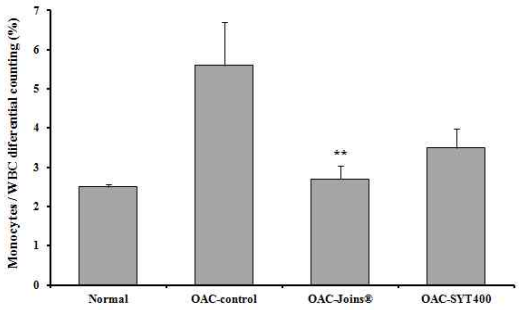

Fig. 14. Effects of SYT on levels of monocyte in the blood of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(**p<0.01).

3) 단핵구 (Monocyte) 비율

정상군 2.5±0.06, 대조군 5.6±1.10, 양성대조군 2.7±0.33, SYT 투여군 3.5±1.27 (%)로 나타나 양성대조군은 대조군에 비하여 유의성(p<0.01) 있는 감소를 나타내었고, SYT투여군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 14).

8. 염증인자의 유전자 발현에 미치는 영향

1) IL-1β mRNA 발현량

대조군의 유전자 발현을 1.07±0.07(RQ)로 했을 때 정상군 0.21±0.03, 양성대조군 0.51±0.02, SYT 투여군 0.83±0.80로 나타나 양성대조군에서 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었고, SYT투여군 에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 15).

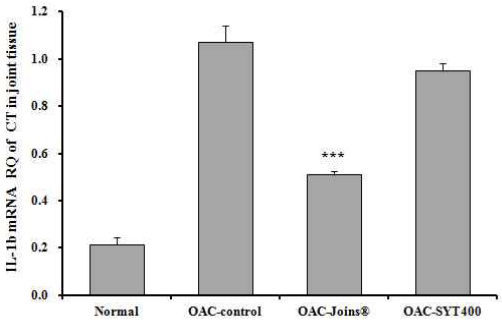

Fig. 15. Effects of SYT on levels of IL-1β mRNA in the joint tissue of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

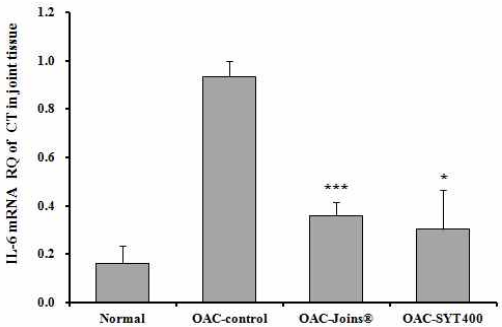

Fig. 16. Effects of SYT on levels of IL-6 mRNA in the joint tissue of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(*p<0.05, ***p<0.001).

2) IL-6 mRNA 발현량

대조군의 유전자 발현을 0.94±0.06(RQ)로 했을 때, 정상군 0.16±0.07, 양성대조군 0.36±0.06, SYT 투여군 0.63±0.17로 나타나 양성대조군과 SYT 투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.001, p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 16).

3) TNF-α mRNA 발현량

대조군의 유전자 발현을 1.01±0.01(RQ)로 했을 때 정상군 0.17±0.04, 양성대조군 0.58±0.01, SYT 투여군 0.65±0.32로 나타나 양성대조군과 SYT 투여군에서 모두 대조군에 비하여 유의성(p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 17).

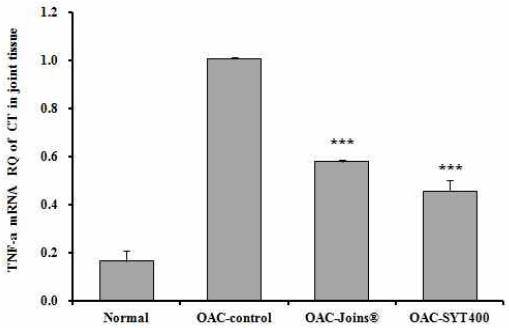

Fig. 17. Effects of SYT on levels of TNF-α mRNA in the joint tissue of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

4) COX-2 mRNA 발현량

대조군의 유전자 발현을 1.13±0.13(RQ)로 했을 때 정상군 0.06±0.03, 양성대조군 0.49±0.06, SYT 투여군 0.75±0.06로 나타나 양성대조군과 SYT 투여군에서 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.001, p<0.05) 있는 감소를 나타었다(Fig. 18).

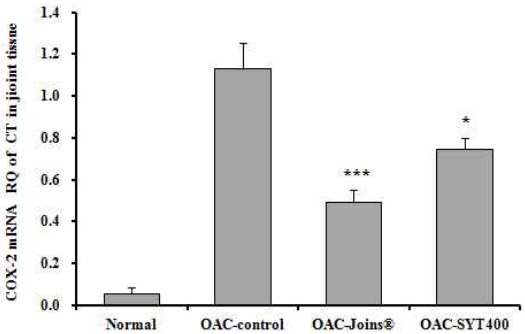

Fig. 18. Effects of SYT on levels of COX-2 mRNA in the joint tissue of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(*p<0.05, ***p<0.001).

5) iNOS-Ⅱ mRNA 발현량

대조군의 유전자 발현을 1.09±0.09(RQ)로 했을 때 정상군 0.25±0.09, 양성대조군 0.51±0.10, SYT 투여군 0.71±0.04로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 각각 유의성(p<0.001, p<0.01) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 19).

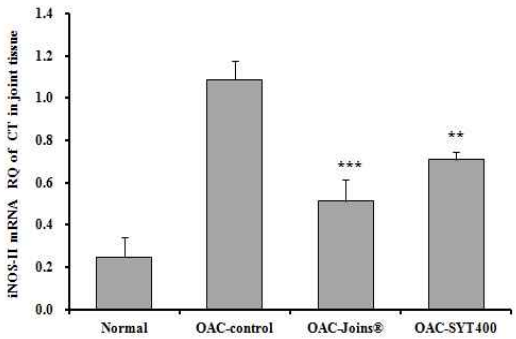

Fig. 19. Effects of SYT on levels of iNOS-II mRNA in the joint tissue of papain-induced mouse. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(**p<0.01, ***p<0.001).

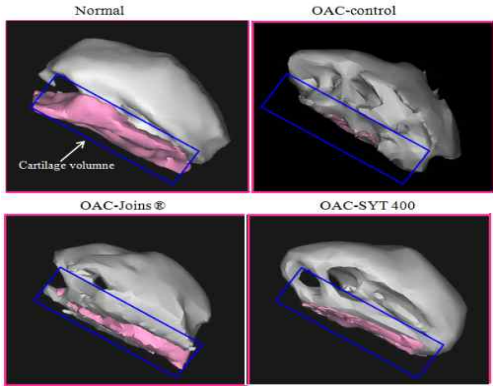

Fig. 20. Imaging of cartilage degeneration using micro CT-arthrography of papain-induced mouse osteoarthritis. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

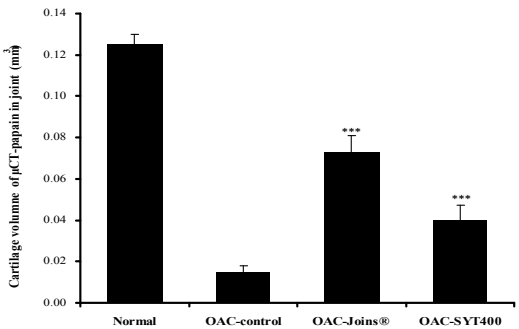

Fig. 21. Effects of SYT on imaging of cartilage degeneration using micro CT-arthrography of papain-induced mouse osteoarthritis. Normal : C57BL/10 normal mice group. OAC-control : Papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins® : Papain-induced osteoarthritis mice and Joins® 100 mg/kg oral treated. OAC-SYT400 : Papain-induced osteoarthritis mice and SYT 400 mg/kg oral treated. Values were represented as means±SD. Statistically significant value compared with control(***p<0.001).

9. 연골파괴에 미치는 영향

실험 종료 후 조영제인 헥사브릭스(Hexabrics 320)를 꼬리 정맥에 주사 후 micro CT-arthrograpy를 사용하여 무릎관절 연골파괴정도는 연골량(cartilage volume)을 측정 및 분석하였다. 연골량은 정상군 0.13±0.01 mm^3, 대조군 0.02±0.01 mm^3, 양성대조군 0.07±0.01 mm^3, SYT 투여군 0.04±0.01 mm^3로 나타나 양성대조군과 SYT투여군 모두 대조군에 비하여 유의성($p<0.001$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 20, 21).

10. 병리 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

정상군에서 슬관절을 구성하는 대퇴골, 경골, 슬개골의 관절연골과 관절반월판의 섬유연골은 정상적인 구조로 관찰되었으며, 관절낭의 활막도 단층의 활막세포로 피복된 정상적인 상태를 유지하고 있었다.

대조군에서는 관절연골은 대부분이 변성 및 괴사되었으며, 대부분의 연골층이 탈락되어 연골하 골조직이 노출되어 있거나 연골세포의 윤곽이 사라지고 엷게 염색되는 균질한 상태로 관찰되었다. 연골층의 탈락으로 관절강내로 노출되어 있는 연골하 골조직은 파골세포의 활성으로 인한 골조직의 침습 및 섬유성 증식으로 인한 재구축과정이 빈발하게 관찰되었다. 반월판 주위의 대퇴골 및 경골의 관절 연골층은 변성 및 괴사되어 있었고, 골외막에 접하는 부위의 연골층에는 핵이 농염된 연골세포가 밀집되어 증식되고 있었다. 슬관절의 관절 활막은 활막세포의 증식으로 인한 비후가 관찰되었다.

양성대조군에서는 변성괴사 된 관절연골의 범위가 감소되어 있었고, 연골층의 탈락으로 인한 연골하 골조직의 노출 및 연골하 골조직 주위의 섬유화 소견과 활막세포의 증식으로 인한 활막의 비후 정도는 대조군에 비해 미약하였다.

실험군에서는 변성괴사 된 관절연골의 범위, 연골하 골조직의 노출 및 연골하 골조직 주위의 섬유화 소견, 활막의 비후 정도가 대조군에 비해 미약하였다(Fig. 22).

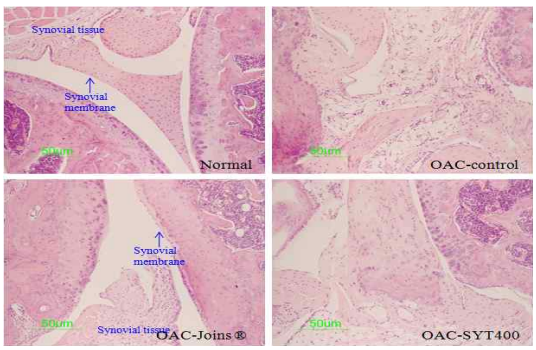

Fig. 22. Effects of SYT on joint pathology(Hematoxylin & Eosin staining) from joint tissue of papain-induced mouse osteoarthritis. Normal: C57BL/10 normal mice group. OAC-control: papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins®: papain-induced osteoarthritis mice and Joins®(100 mg/kg) oral treated. OAC-SYT400: papain-induced osteoarthritis mice and SYT(400 mg/kg) oral treated. SYT: Sayeok-tang. In normal, articular cartilages are cell developed. In OAC-control, most of articular cartilage was degenerated and desquamated. Note exposure of subchondral bone, fibrosis and activation of osteoclasts around subchondral bony tissue. In OAC-Joins® and OAC-SYT, most of articular cartilages are degenerated and appeared homogeneous, but chondrocytes in periphery of degenerated area are remained. Fibrosis and activation of osteoclasts are more mild than OAC-control.

2) Safranin-O 염색

정상군의 관절은 빨간색으로 염색된 연골조직이 정상적으로 위치하는 반면, 대조군은 연골의 파괴로 빨간색 염색이 나타나지 않았으며, SYT 투여군은 연골의 파괴정도가 적어 대조군에 비하여 빨간색 염색 조직이 많이 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 23).

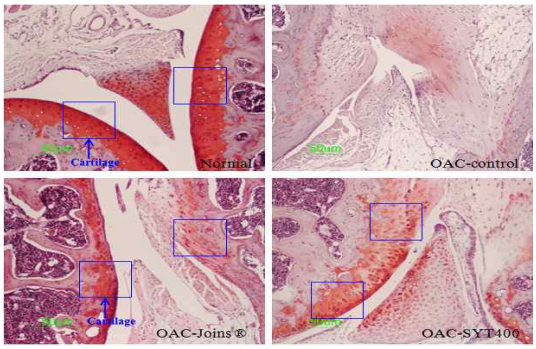

Fig. 23. Effects of SYT on joint pathology (Safranin-O staining) from joint tissue of papain-induced mouse osteoarthritis. Normal: C57BL/10 normal mice group. OAC-control: papain-induced osteoarthritis mice group. OAC-Joins®: papain-induced osteoarthritis mice and Joins®(100 mg/kg) oral treated. OAC-SYT400: papain-induced osteoarthritis mice and SYT(400 mg/kg) oral treated. SYT: Sayeok-tang. Stain intensity of red color increased in proportion to proteoglycan content in normal. The red color disappeared in almost articular cartilage and red color remained in periphery of necrotic area in OAC-control. Compare the stain intensity and areas of red color in OAC-Joins® and OAC-SYT with the normal and OAC-control.

고 찰

골관절염은 관절통의 가장 흔한 원인이며, 성인에서 보행 및 일상생활동작에 제한을 일으키는 중요한 원인 가운데 하나로 관절연골의 파괴와 연골하 골조직의 재형성을 특징으로 한다[17].

골관절염은 원발성과 이차성으로 나눌 수 있는데 원발성은 다발성 퇴행성 관절염으로 특히 체중 부하되는 관절에 많이 발생하는데 50세 이상 비만한 환자에서 많이 발생하는 것으로 알려져 있다[1].

골관절염의 발생빈도는 최근 고령인구가 증가함에 따라 점차 증가하고 있는 추세이다.

2009년도 국민건강영양조사에서 골관절염 환자는 만 50세 이상에서 여자 32.5%, 남자 14.7%로 여자가 월등히 높았고[18], 특히 노령화될수록 유병율도 높아져 65세 이상은 37.8%로 보고되어 연구자들 사이에서도 관절염에 대한 관심[19]이 높아지고 있으며 퇴행성 관절염 연구회의 규모도 해마다 증가하는 추세이다.

한의학에서 골관절염은 痺病의 범주에 속한다고 볼 수 있으며[20], 『黃帝內經:素問 · 痺論』[21]에서 痺病은 風寒濕에 의하여 발생한다고 하였으며 行痺, 痛痺, 着痺, 肝心脾肺腎의 五臟痺, 筋脈肌皮骨의 五痺에 대해 언급하고 있다. 漢代 張仲景은 『傷寒論』[22] 太陽病脈證幷治篇과 『金匱要略』[23] 痙濕暍病脈證幷治篇, 中風歷節病脈證幷治篇에서 太陽風濕, 濕痺, 歷節病을 언급하며 그 증상으로 "歷節痛 不可屈伸", "其痛如掣", "諸肢節疼痛 身體魁 脚腫如脫" 하여 증상에 따라 처방을 달리 하였다.

골관절염의 병태 생리는 여러 주장과 가설이 있을 수 있는데 크게 두 가지로 살펴 볼 수 있다. 첫째, 연골기질(cartilage matrix)의 손상과 변화, 둘째 조직의 손상에 대한 연골세포의 감소로 나누어진다.

첫째는 여러 기계적인 자극이나, 염증으로 인한 효소 반응, 대사의 변화 등으로 시작되며, 기질고분자(matrix macromolecule)의 격자가 파괴되고, 수분 함량의 변화가 일어난다. 둘째는 연골세포가 조직손상이나 변화를 감지하면서 시작되는데 동화작용 및 이화작용이 모두 증가된다. 이는 주로 IL-1과 종양괴사 인자인 TNF-α와 같은 cytokine에 의해 이뤄지는 파괴와 재형성과정이다[2,17].

골관절염의 일반적인 치료는 보존적 치료를 시행하나, 보존적 치료에 반응하지 않거나 관절의 변화가 진행하는 경우에는 수술적 방법을 시행하게 된다[4]. 현재 사용되고 있는 항염증제 약물 치료로 완치가 어렵고, 고령화에 따른 장기간 약물 투여로 인한 부작용의 문제점이 있어, 적극적인 증상의 호전 및 연골의 보호와 재생효과를 목표로 한 천연물을 이용한 개발이 필요한 시점이다.

2002년에는 처음으로 위령선, 과루근, 하고초를 이용한 국내 천연물 신약 조인스 정이 시판되어 기존의 항염증제 약물 치료에서 전통의학의 천연물 신약으로 전환하는 계기를 마련하였다[24].

최근 한의학계에서도 골관절염 유발 동물모델을 이용한 여러 실험적 연구에서 蠲痺湯[11], 附子湯[12], 秦艽 · 威靈仙 · 夏枯草 복합방[13] 등의 한약 처방이 골관절염의 진행을 억제하는데 효과있음을 보고하고 있다.

이번 연구에서 사용된 사역탕은 『傷寒論』의 처방으로 길익동동은 "治四肢厥逆 身體疼痛 下利淸穀, 或 小便淸利者"[14]라 하였고, 發汗 또는 下利, 手足厥冷, 사지와 신체는 때때로 拘攣, 疼痛, 구토가 있을 때 응용[25]함에 착안하여 저자는 골관절염이 연령이 증가함에 따라 유병률도 높아지는 특성상 사역탕이 正氣가 不足하여 陽虛, 虛寒한 상태의 고령자의 신진대사 작용을 향상시키고 아울러 혈액순환을 개선시킬 수 있어 만성 및 골관절염 질환에 적합할 것으로 생각하였다.

부자는 『藥徵』[14]에서 "主逐水也. 故能治惡寒. 身體四肢及骨節疼痛. 或沈重. 或不仁. 或厥冷. 而旁治腹痛. 失精. 下利"라 하여 逐水작용에 의한 통증 억제 효과를 표현하였다. 이에 대한 실험적 연구로 鄭 등[26]은 부자의 진통 소염 효과, 김[27]은 collagen 관절염 동물모델에서 항염증 효과를 실험적으로 보고하였으며, 朱[28]는 부자를 경구 투여하여 궤양시 鎭痛정도, 腹瀉의 감소 정도와 熱板法 등을 이용한 鎭痛실험에서 鎭痛작용이 뛰어남을 보고하였다.

감초는 『藥徵』[14]에서 "主治 急迫也. 故治 裏急 急痛 攣急, 而旁治 厥冷 煩躁 衝逆之等 諸般急迫之毒也"하여 補脾益氣, 淸熱解毒, 潤肺止咳의 효능을 가지고 있으며, 현대 약학적 연구결과[29]에 의하면 주성분인 glycyrrhizin의 분해산물 glucuronic acid가 생체의 간장 유해물질과 결합하여 glucuronide로 되어 해독작용을 한다.

건강은 『藥徵』[14]에서 "主治 結滯水毒也. 旁治 嘔吐 咳 下利 厥冷 煩躁 腹痛 胸痛 腰痛"이라 하였고, 송[30]은 溫中, 回陽, 溫肺

化痰의 효능작용으로 혈액순환을 촉진하고, 健胃, 止嘔 작용과 反射性에 혈관운동중추를 흥분시켜 혈압을 상승시킨다고 하였다.

사역탕의 임상응용에서 살펴보면 脾胃虛寒에 많이 사용되며, 痰飮, 虛寒, 虛脫, 亡陽 등의 증에 回陽救逆, 溫中散寒, 止痛의 효능으로 노령화에 따른 陽虛, 虛寒 증에 대표적 방제이다.

이에 본 연구에서는 항염증 및 진통효과가 있는 약물로 구성된 사역탕이 퇴행성 골관절염에 미치는 치료 효과를 규명하고자 하였다.

실험은 간・신장 기능에 미치는 영향, 염증성 지표로서 IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1의 혈청내 염증 cytokine에 미치는 영향, thromboxane B_2, prostaglandin E_2, leukotriene B_4 등의 염증성 매개인자의 혈액내 농도 및 혈액 내 면역세포에 미치는 영향, 염증 인자의 유전자 발현, 연골 및 활막 조직의 병리조직학적 변화를 결과를 분석한 결과 골관절염의 진행을 억제하는데 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 연구에서 papain으로 유도된 동물모델을 이용하였는데, papain은 파파야 열대과일에서 추출한 천연 단백질 분해효소로 섬유질 속의 단백질 체인과 연결조직들을 분해하고 근육 세포조직을 연화시키는 작용을 한다. papain으로 유도된 골관절염 동물 모델을 이용한 실험으로는 Nergis M 등[31], George Bentley[32], S. Panickery 등[33], 이[34] 의 연구에서 살펴볼 수 있다.

본 연구에서 SYT의 안정성 평가를 위해 간기능과 신기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간과 신장의 기능을 측정하는 척도에 해당하는 혈청 중의 AST, ALT, BUN, creatinine 농도를 측정한 결과 간과 신장 기능에는 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 2-4).

IL-1과 TNF-α는 연골세포의 이화작용 및 파괴에 관여하는 매우 중요한 효소이다[4]. IL-1은 가장 처음 기록된 cytokine의 하나로 활성화된 macrophage에서 생성되며 IL-1α, IL-1β, IL-1 receptor antagonist의 3종류가 있다[35]. 이 중 IL-1β는 골관절염에서 연골세포로부터 기질금속 단백분해효소의 생성과 분비를 촉진시켜 연골기질의 고분자 파괴를 증가시키고, 골관절염의 증상발현에 중대한 역할을 하는 prostaglandin E_2의 생성을 촉진시켜 기질성분의 상실을 충분히 보충하지 못하게 한다[36,37].

IL-6은 IL-1과 TNF-α에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질로 골관절의 염증반응에 주된 매개 작용을 하여 혈청 및 관절염으로 손상된 관절의 관절 액에서 활성도가 증가하며, 골관절염의 활성도와 연관성이 있다[38,39]. 또한 katherine 등[40]은 IL-6이 활액막이나 관절조직의 혈관에서 분비되어 혈청에서보다 관절액에서 더 높은 활성도를 보인다고 하였는데, 이는 IL-6이 골관절염에서 면역반응의 매개체로서 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

Monocyte chemoattractant protein-1(이하 MCP-1)은 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 대식세포, monocyte, mast cell, neutrophil, astrocyte, fibroblast 등의 많은 세포에서 분비되는 cytokine으로 세포성 면역반응이나 세포 성장, 분화 등에 관련되어 있다. 또한 MCP-1은 면역체계에서 세균의 감염 시 염증반응을 매개하여 이를 제거하는 역할을 하며 혈관내피세포를 자극하여 주위의 세포들을 자연사시키는 역할을 하기도 한다[41,42].

본 연구에서 혈청 내 염증 cytokine에 미치는 영향을 알아보고자 IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α 생성량을 측정한 결과 4가지 항목 모두 SYT 투여군과 양성대조군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5-8).

Thromboxane B_2 역시 혈소판에 자극을 가하면 phospholipase에 의해 막 인지질에서 arachidonic acid가 유리되면 cyclooxygenase, hydroperoxidase, thromboxane synthetase에 의하여 thromboxane A2에서 비효소적으로 생산된다. 이 역시 비만세포에 작용해 혈소판응집과 혈관 확장을 일으킨다고 알려져 있으며, 동물실험에서 염증을 일으키는 것으로 보고되고 있다[43].

Leukotriene B_4(이하 LTB_4)은 prostaglandin과 마찬가지로 arachidonic acid에서 5-lipoxygenase에 의해 생합성 된다. 감각과민을 일으키는 내인성 화학 물질로서 항원을 파괴하는 염증반응으로 인하여 축적되는 다핵 중성구에 대한 화학 주성 인자라고 알려져 있으며[44], 염증성 반응의 중개자로 작용하는 많은 물질 중에서 히스타민보다 수백 배 정도로 강력하게 작용한다고 한다[45].

본 연구에서 혈청 내 염증 매개인자인 Thromboxane B_2, LTB_4, prostaglandin E_2를 측정한 결과 Thromboxane B_2, prostaglandin E_2 항목에서는 SYT 투여군에서 대조군보다 유의한 감소를 보였으며(Fig. 9, 11), LTB_4 항목에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 10).

백혈구는 염증 반응과 면역 반응의 주된 세포성분이며 과립구, 림프구, 단핵구로 구성되는데, 이들 각각은 별도의 생리기능이 있다. 이 중 호중구는 보통 급성 염증에서 특징적으로 출현하나 지속적인 만성염증에서도 상당수가 침윤하여 농양형성에 기여하며, 단핵구는 염증이 시작된 지 48시간에 최고에 다다르고 만성 염증에서는 단핵구의 침윤이 가장 특징적이다[46].

본 연구에서의 혈액 내 백혈구 양은 정상군, 대조군, 양성대조군, SYT 투여군 모두 비슷하게 측정되었으며(Fig. 12), 백혈구에 대한 호중구와 단핵구 비율은 SYT 투여군이 대조군에 비해 감소를 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 13, 14).

Nitric oxide(이하, NO)는 골관절염에서 혈액 유입 증가, chondrocytes에 의한 matrix 생산의 억제, metalloproteinases의 활동, 면역 반응의 변화, osteoblast 활동 억제, cytokine 유발 및 osteoclastic bone resorption의 증진 등에 관여한다고 보고되었다[47]. 실제로 관절염 조직에서 염증성 cytokine인 IL-1이 다량 존재하고 과다한 NO를 생성하는 inducible Nitric oxide synthase (이하, iNOS)가 발현되는데, 과다 생성된 NO는 염증성 연골세포의 정상 대사과정 중에 대량 생성되는 활성산소와 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite를 생성함으로써 연골세포에 산화적 스트레스를 가하여 관절염의 원인이 되는 것으로 추정되고 있다[48]. 최근 동물 실험에서 관절 염증과 조직 손상이 Nitric oxide synthase 억제제의 투여로 감소되었다는 보고[49]는 이 같은 사실을 입증해주고 있다.

COX는 prostaglandin endoperoxide H synthase라고도 하며, arachidonic acid로부터 thromboxane과 prostaglandins로 전환하

도록 가수분해시키는 중요한 효소로, COX-1과 2의 두 가지 형태로 존재한다[50]. COX-2는 염증부에 존재하고 endotoxin과 mitogen, cytokine 등과 같은 염증 전 물질들에 의해 합성되며, IL과 TNF와 같은 cytokine에 의해 염증 반응 부분에서 유도된다[51].

염증인자의 유전자 발현량을 알아보기 위해 실험을 종료한 후 생쥐의 무릎 관절 조직을 분리하여 Real Time Quantitative RT-PCR을 이용, IL-1β mRNA, IL-6 mRNA, TNF-α mRNA, COX-2 mRNA와 iNOS-Ⅱ mRNA 발현을 측정한 결과 양성대조군과 SYT 투여군에서 IL-6 mRNA, TNF-α mRNA, COX-2 mRNA, iNOS-Ⅱ mRNA 발현에 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 특히 TNF-α mRNA 발현에서는 양성대조군인 조인스 정 투여군보다 감소량이 컸다(Fig. 16-19). 또한, IL-1β mRNA 발현에서는 SYT 투여군이 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 17, 18).

이상의 결과에서 특히 주목할 만한 사실은 연골기질 파괴의 이화작용과 관절연골 기질로부터 다당단백의 소실율을 증가시키고 재합성을 억제하여 기질 성분의 상실을 보충하지 못하게 하는 TNF-α와 PGE_2의 혈청내 측정량 및 유전자 발현 정도가 관절염 전문의약품으로 판매되고 있는 조인스 정보다 감소되어 있다는 것이다. 이런 결과는 사역탕이 관절염에 대해 유의한 효과가 있음을 예측할 수 있게 해준다.

무릎관절 연골의 파괴 정도를 분석하기 위해 Micro CT-arthrography를 사용하여 연골량(cartilage volume)을 측정하였으며, SYT 투여군에서는 대조군의 약 2배, 조인스 정 투여군에서는 대조군의 약 3배 정도의 연골량을 나타내어 SYT 투여군과 양성대조군 모두 연골파괴 억제효과가 유의하게 있음을 보여주었다(Fig. 20).

염증반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증세포의 조직침윤 정도를 파악하기 위해 무릎 관절조직을 H&E로 염색하여 관찰하였으며, 연골조직의 손상여부를 확인하기 위해 proteoglycan층을 Safranin-O로 염색하여 결과를 확인하였다.

대조군은 관절주변에 연골과 뼈의 침윤으로 관절 구조를 알아보기 어려웠으나 SYT 투여군에서는 관절 주변에 대조군에서 관찰된 대식세포, 과립구세포, 단핵구 세포, 활막 염증화 세포, 그리고 활막 세포 hyperplasia의 침투에 의한 연골과 뼈의 침윤 등이 많이 억제되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 21). 또한 Safranin-O 염색에서 papain으로 연골의 파괴가 나타난 대조군에서는 빨간색 염색 조직이 거의 사라졌으며, SYT 투여군은 빨간색 염색 조직이 활막 주변에 많이 분포하고 있어 육안으로도 대조군과 비교하여 연골의 파괴 정도가 확연히 적음을 나타내고 있다(Fig. 22).

이상의 실험 결과를 종합하면 사역탕의 투여가 papain으로 유도된 흰쥐의 골관절염 모델에서 IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α의 염증 cytokine의 생성을 억제하고, thromboxane B_2, prostaglandin E_2, LTB_4, iNOS-Ⅱ의 염증 매개인자의 유의한 감소, 백혈구 내 호중구 단핵구의 비율 감소, 골관절의 조직학적 염증소견 감소, 연골파괴와 활막 주변 proteoglycan의 파괴를 억제하는데 유의한 효과가 있음을 보여주었다.

앞으로 사역탕이 골관절염에 대한 작용기전 및 항염증효과에 대한 연구와 더불어 임상적인 연구가 이루어진다면 유효한 효과가 있을 것으로 기대된다.

결 론

四逆湯이 papain으로 유도된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여, 간·신장 기능에 미치는 영향, 혈청 내 염증 cytokine에 미치는 영향, 염증성 매개인자의 혈액내 농도 및 혈액 내 면역세포에 미치는 영향, 염증인자 유전자 발현, 연골 및 활막조직의 조직학적 변화를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

간과 신장의 기능을 측정하는 척도에 해당하는 혈청 중의 AST, ALT, BUN, creatinine 농도를 측정한 결과 특별한 영향은 없었다. 염증성 지표인 IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 혈청 내 염증 매개인자인 Thromboxane B_2, prostaglandin E_2 는 대조군보다 유의한 감소를 보였으며, LTB4는 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 혈액 내 백혈구에 대한 호중구와 단핵구 비율은 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 대관절 조직의 IL-6 mRNA, TNF-α mRNA,COX-2 mRNA, iNOS-Ⅱ mRNA 발현량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, IL-1β mRNA 발현량은 대조군에 비하여 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. Micro CT-arthrography를 이용한 연골량(cartilage volume) 측정에서 대조군에 비하여 연골파괴 억제효과가 유의하게 나타났다. Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색에서 대조군에 비하여 병리조직학적 염증소견이 감소하였고, Safranin-O 염색에서 대조군에 비하여 관절주변 면역세포의 침투에 의한 연골과 뼈의 침윤이 감소하였으며 활막주변 proteoglycan의 손상이 상대적으로 감소하였다.

이상의 결과로 사역탕은 papain으로 유발된 골관절염을 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 임상적으로 골관절염 치료에 유효할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울, 군자출판사, pp 84-86, 97-98, 2011.
2. Patrick, D.W., Ronald, M., 통증학 편찬위원회 편. Textbook of pain Ⅰ. 서울, 정담, pp 575-589, 2002.
3. 통계청. 장래인구추계(2010～2060). http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_ko/5/2/index.board?bmode= read&aSeq=252646.
4. 대한정형외과학회. 정형외과학 제 1권. 서울, 최신의학사, pp 253-258, 2006.
5. 송영준, 하철원. 골관절염의 치료에서 COX-2 선택적 비스테로이드성 소염진통제의 이용. 대한슬관절학회지 21(2):84-92, 2009.

6. 김가은, 박상민, 홍석원, 지선미, 박동아, 최슬기. 골관절염 환자에서 글루코사민의 임상적 효과. 한국보건의료연구원. Neca-Rapid 보고서 11-002. pp 1-83, 2011.
7. 서승석, 김창완, 하동준, 최장석, 김호준, 이창락. 슬관절의 대퇴골과 골연골 결손에 대한 자가골연골 이식술. 대한정형외과학회지 44(3):301-310, 2009.
8. Kuo, A.C., Rodrigo, J.J., Reddi, A.H., Curtiss, S., Grotkopp, E., Chiu, M. Microfracture and bone morphogenetic protein 7(BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage. 14: 1126-1135, 2006.
9. 김덕희. 활락단의 Adjuvant 유발 관절염 진행 억제 효과. 세명대학교 대학원, 2009.
10. 임동욱, 김미연, 송미경, 김지영, 이동헌, 박주연, 부영민, 김호철. 한약복합물 HT008이 흰쥐 관절염 모델에 미치는 효과. 대한본초학회지 24(4):197-204, 2009.
11. 박동수, 김순중, 정수현, 서일복. 蠲痺湯이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염의 초기변화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 25(1):84-91, 2011.
12. 김지영, 김순중, 서일복, 정수현. 부자탕이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염의 초기변화에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 21(2):87-100, 2011.
13. 이승헌, 정수현, 김순중, 서일복. 秦艽・威靈仙・夏枯草 복합방이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 18(1):75-94, 2008.
14. 노의준, 강한은. 古方類聚. 서울, 고방출판사, pp 592-596, 2009.
15. 복치의학회. 도해유취방. 복치의학회출판국, pp 324-325, 2010.
16. 李載熙. 도설 한방진료요방. 서울, 의방출판사, pp 395-397, 2004.
17. 한태륜, 방문석. 재활의학 셋째판. 서울, 군자출판사, pp 905-908, 2009.
18. 진수희. 2009년 국민건강통계. 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009). 서울, 보건복지부 건강정책과, p 66, 2010.
19. 김현아. 퇴행성 관절염의 임상연구. 대한류마티스학회지 7(3):205-211, 2000.
20. 김기현. 痺證. 서울, 정담출판사, pp 23-29, 1993.
21. 王琦 外. 黃帝內經素問今釋. 서울, 成輔社, p 206, 1983.
22. 蔡仁植. 傷寒論譯詮. 서울, 高文社, pp 9-141, 1984.
23. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北, 大聯國風出版社, pp 30-39, 1950.
24. Simon elegant. Herbal healing. TIME magazine, 2002.6.10. available URL:http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,257167,00. htmlixzz1d24Lrq4r.
25. 황도연. 대역 증맥 방약합편. 서울, 남산당, p 129, 1992.
26. 정선희, 박동역. 부자약침이 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 대한침구학회지 14(1):334-336, 1997.
27. 김윤희. 부자약침이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. 대전대 한의과대학 침구학과대학원 박사학위논문, 2006.2.
28. 朱自平. 부자온중지통약리연구. 중국중약잡지, 17(4):238-241, 1992.
29. 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배 편저. 한약의 약리, 성분, 임상응용. 서울, 계축문화사, pp 695-699, 1982.
30. 송인성. 감초건강탕의 임상적 효능에 관한 소고. 경성대학교 임상약학 대학원 학위논문, 2000.
31. Nergis, M., Bahattin, K., Sermin, O., Vasfi, K., Sedef, G. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the mankin score. Acta orthop traumatol turc. 41(3):233-237, 2007.
32. George, B. Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits. The journal of bone and joint surgery. 53(2):324-337, 1971.
33. Panickery, S., Borgiayz, J., Fhiedy, C., Mikeczyx, K. Oral glucosamine modulates the response of the liver and lymphocytes of the mesenteric lymph nodes in a papain-induced model of joint damage and repair. Osteoarthritis and Cartilage. 17: 1014-1021, 2009.
34. 이삼규. 단일관절염 유발 백서에서의 관절통의 동적 정량화. 전북대학교 대학원 의과대학 박사학위논문, 2002.
35. Dinarello, C.A. The interleukin-1 family: 10years of discovery. FASEB J. 8(15):1314-1325, 1994.
36. Hulejova, H., Baresova, V., Klezl, Z., Polanska, M., Adam, M., Senolt, L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. Cytokine. 38(3):151-156, 2007.
37. Martel-pelletier, J., Pelletier, J.P., Fahmi, H., Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Semin Arthritis Rheum. 33(3):155-167, 2003.
38. Simi, T. Inhibition of IL-6, IL-10 Signaling and star activation by inflammatory and stress pathways. J. Immunol. 165: 5227-5237, 2000.
39. Jacqueline, U., Alejiandro, B. Dorsa PS. Soluble IL-6 receptor and different arthropathies, J. Rheumatol. 24: 2069-2075, 1997.
40. Katherine, L., Manson, T.L., Moor, J.M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with juvennile rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 21: 2359-2363, 1994.
41. Conti, P., Boucher, W., Letourneau, R., Feliciani, C., Reale, M., Barbacane, R.C., Vlagopoulos, P., Bruneau, G., Thibault, J., Theoharides, T.C. Monocyte chemotactic protein-1 provokes mast cell aggregation and [3H] 5HT release. Immunology. 86(3):434-440, 1995.
42. Bischoff, S.C., Krieger, M., Brunner, T., Dahinden, C.A. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. J. Exp. Med. 175(5):1271-1275, 1992.

43. 백대현, 장주해, 하기용. 흰쥐에서 Leukotriene B_4와 Thromboxane B_2가 요추 신경근에 미치는 영향. 대한척추외과학회지 8(1):8-14, 2001.
44. Ford-hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Natur. 286: 264-265, 1980.
45. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology. 5th ed. Mosby. pp 66-69, 1998.
46. Kasper. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학. 서울, 도서출판, pp 2083-2084, 2006.
47. Hirai, Y., Migita, K., Honda, S., Ueki, Y., Yamasaki, S., Urayama, S., Kamachi, M., Kawakami, A., Ida, H., Kita, M., Fukuda, T., Shibatomi, K., Kawabe, Y., Aoyagi, T. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. Life Sci. 68(8):913-920, 2001.
48. Beuerova, K., Bezek, A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. Gen Physiol Biophys. 18: 15-20, 1999.
49. Aley, K.O., McCarter, G., Levine, J.D. Nitric Oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. J Neurosci. 18(17):7008-7014, 1998.
50. Smith, W.L., DeWitt, D.l. Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenase)-1 and 2. Adv immunol. 62: 167-215, 1996.
51. Brune, K., Hinz, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and diffences. Scand J Pheumatol. 33: 1-6, 2004.