

## 부자탕 추출물이 골관절염 동물 모델에 미치는 영향

박중현 · 양두화 · 우창훈 · 안희덕  
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

### Effects of *Buja-tang* Extract on Osteoarthritic Animal Model

Jung-Hyun Park, K.M.D., Doo-Hwa Yang, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D., Hee-Duk An, K.M.D.  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

**Objectives** The present study was designed to find out the therapeutic effects and possible underlying mechanism of *Buja-tang*, a herbal complex formula on experimental monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis.

**Methods** Osteoarthritis models were created via intra-joint injection of MIA (50  $\mu$ L with 80 mg/mL) in rats. Rats were divided into five groups and each group consisted of seven. Normal group was not injected MIA and did a normal diet. Control group injected MIA and received distilled water. Indo injected MIA and oral administration of 5 mg/kg of indomethacin. BJTL injected MIA and oral administration of 100 mg/kg of *Buja-tang*. BJTH injected MIA and oral administration of 200 mg/kg of *Buja-tang*. We analyzed weight-bearing ability of hind paws, oxidative stress related factor, anti-oxidant protein, inflammatory protein, inflammatory messenger and cytokine in joint tissue. Pathological observation of knee cartilage tissue structures was also performed with hematoxylin & eosin and safranin-O chromosomes.

**Results** Weight-bearing ability of hind paws showed a tendency to reduce pain. The incidence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and p22<sup>phox</sup> in articular tissue was significantly reduced, and the incidence of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 and heme oxygenase-1 and superoxide dismutases was significantly increased. The incidence of phosphorylated inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$ , nuclear factor-kappa B p65, inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)-6, and IL-1 $\beta$  decreased significantly. In pathological observation, cartilage tissue damaged by MIAs in biopsy has significantly recovered from *Buja-tang* administration.

**Conclusions** *Buja-tang* has anti-inflammation, antioxidation and pain relief effects. So this is thought to inhibit the progress of osteoarthritis in rat caused by the MIA. (J Korean Med Rehabil 2021;31(1):17-32)

**Key words** Iodoacetic acid, Osteoarthritis, *Buja-tang*, Anti-inflammatory agents, Antioxidants

RECEIVED December 14, 2020  
REVISED December 23, 2020  
ACCEPTED December 30, 2020

**CORRESPONDING TO**  
Hee-Duk An, Department of  
Rehabilitation Medicine of Korean  
Medicine, College of Korean  
Medicine, Daegu Hanny University,  
136 Sincheondong-ro,  
Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2116  
FAX (053) 770-0566  
E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2021 The Society of  
Korean Medicine Rehabilitation

### 서론»»»»

골관절염(osteoarthritis)은 외상, 비만, 선천적 질환, 대사성 질환, 염증성 질환, 신경병증성 관절질환 등이 원

인으로 발생하며, 주로 체중부하 관절을 많이 침범하는 성인에게 흔한 질환으로 퇴행성 관절 질환(degenerative joint disease)이라고도 한다<sup>1)</sup>. 또한 국소적인 관절에 점진적으로 관절연골의 소실과 이와 관련된 2차적인 증

상과 변화를 수반하는 질환으로 대개 전신증상은 없으며 특별한 활동을 할 때 유발되는 국소 관절의 통증이 가장 흔하다. 이 외에도 관절의 잠김이나 불안감을 호소하는 증상이 나타나기도 한다<sup>2)</sup>.

한의학에서 골관절염은 痺病證의 범주에 속한다. 『靈樞』에서 관절은 기혈이 운행하는데 중요한 부위이지만 쉽게 外邪가 침범할 수 있는 곳이라고 하였다. 痺病은 관절을 중심으로 활동장애 및 腫大, 疼痛, 重着, 關節酸楚 등의 특징을 보여 關節痺證이라고 하였으며 병리적으로 氣血不通하여 나타나는 것이므로 각종 痺病의 공통된 치료법은 宣通이다<sup>1)</sup>.

『東醫寶鑑』에 風痺, 濕痺, 寒痺에는 모두 附子湯을 쓰야 한다고 하였다<sup>3)</sup>. 附子湯은 附子, 人蔘, 白芍藥, 桂枝, 白茯苓, 甘草, 白朮, 生薑으로 구성된 처방으로 각각의 본초들은 항산화 또는 항염증에 대한 연구가 보고되었다<sup>4-11)</sup>. 이들 약물의 복합제제인 附子湯도 항염증 및 風寒濕으로 발생된 골관절염에 대해서 효과가 있을 것으로 기대된다. 기존에 골관절염 초기 변화에 대해 附子湯의 효과를 연구한 논문은 있었으나<sup>12)</sup>, 양약의 효능과 비교한 연구는 없었기에 본 연구를 하게 되었다. 이에 저자는 monosodium iodoacetate (MIA)를 이용하여 골관절염을 유발시킨 rat에 附子湯과 indomethacin을 처리하고 그 결과를 분석하고 비교하여 유의한 결과를 도출하였기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»

### 1. 재료

#### 1) 시약

실험 중 사용된 MIA, dithiothreitol (DTT), phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)는 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입했으며, indomethacin은 SK케미칼(J200; 성남, 한국)에서 구입했다. Zoletile 50 mixture는 Virbac (Carros, France)에서 구입했다. 1차 항체 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), p22<sup>phox</sup>, inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$ , heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD)와 nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ Bp65), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), inter-

leukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) interleukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2), phosphorylated inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS),  $\beta$ -actin, histone과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 또한, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX4)는 Life Span Bio Sciences (Seattle, WA, USA)로부터 구입하여 사용했다. 그리고 protease inhibitor와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)에서, Enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection Reagents는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, nitrocellulose membrane은 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입 후 실험에 사용했다. BCA protein assay kit는 단백질 정량을 하기 위해 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입했다.

#### 2) 동물

7주령의 웅성 Sprague-Dawley rat (몸무게 200~250 g)을 대한바이오링크(음성, 한국)에서 공급받아 실험 시작일까지 충분한 고형 사료(삼양사, 서울, 한국)와 물을 공급하고, 12시간 명암주기(light-dark cycle)을 유지하며 습도는 55±5%로, 온도는 22±2°C로 조절된 사육실에서 1주 동안 적응한 후 실험에 사용하였다. 또한 본 연구의 동물실험에 관한 윤리와 효율적 관리를 위한 제반 사항은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: DHU2019-094)을 받았다.

#### 3) 약재

본 실험에서 사용된 처방의 약재는 『東醫寶鑑』<sup>3)</sup>에 따라 옴니허브(대구, 한국)에서 구입하고 정선 후에 사용하였으며 1첩의 용량은 Table I과 같다.

附子湯 약재 149.7 g 분량에 증류수 1,497 mL를 더하여 2시간동안 열탕 추출기로 추출하여 얻은 액을 감압 증류장치에서 농축시킨 후 동결 건조기로 완전 건조시킨 附子湯 추출물 (BJT) 19.7 g (수율 13.16%)을 얻었다. 附子湯 추출물은 사용하기 바로 전까지 냉동보관(-80°C)하였다.

**Table I.** Composition and Amount of *Buja-tang*

Pharmacognostic name	Amount (g)
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	3.75
<i>panax ginseng</i> C. A. Meyer	3.75
<i>paeonia lactiflora</i> Pallas	3.75
<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	3.75
<i>poria cocos</i> Wolf	3.75
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	3.75
<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	5.625
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	9.3
Total amount	37.425

#### 4) 실험기기

실험에 사용한 기기들은 열탕추출기(DWT-1800T; 대웅, 서울, 한국), vortex mixer (Stauart, Staffordshire, UK), 회전증발농축기(Buchi B-480; Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), (냉장)고속원심분리기(Mega17R; 한일과학, 대전, 한국), 동결건조기(FD5508; 일신바이오 베이스, 양주, 한국) 전자체중계(카스(주), 양주, 한국), 체중부하측정기(incapacitance tester; Linton Instrument Co., Palgrave Diss, UK), tissue grinder (Bio Spec Product, Bartlesville, OK, USA), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd., 부천, 한국)이었다.

## 2. 방법

### 1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

附子湯의 항산화 효능을 평가하기 위하여 DPPH free radical 소거법을 활용했다<sup>13)</sup>. 0.2 mM의 DPPH용액(100 µL)과 附子湯을 농도별로 희석한 용액(100 µL)을 혼합하여 37°C 실온의 암소에 30분간 둔 후 흡광도 540 nm에서 측정하였으며, L-ascorbic acid은 양성대조군으로 본 실험에 사용했다. 흡광도는 아래의 식을 사용하여 값을 구했다.

DPPH 라디칼 소거능(%)

$$= \{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

OD<sub>control</sub>: 시료가 포함되지 않은 흡광도

OD<sub>sample</sub>: 시료가 포함된 흡광도

### 2) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) 라디칼 소거능 측정

附子湯의 항산화 효능을 평가하기 위하여 ABTS free radical 소거법을 활용했다<sup>14)</sup>. 7 mM의 ABTS용액과 2.4 mM의 potassium persulfate를 혼합한 후 실온의 암소에 두었다가 약 16시간 이상 방치한 후 ABTS<sup>+</sup>을 형성시켜 415 nm의 흡광도에서 0.70±0.02가 되도록 에탄올로 희석했다. 희석된 용액(95 µL)에 附子湯 5 µL를 가한 후 15분간 방치하여 흡광도를 측정하였고, L-ascorbic acid는 본 실험에서 양성대조군으로 사용했다. 흡광도는 아래의 식을 사용하여 값을 구했다.

ABTS 라디칼 소거능(%)

$$= \{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

OD<sub>control</sub>: 시료가 포함되지 않은 흡광도

OD<sub>sample</sub>: 시료가 포함된 흡광도

### 3) 약물투여와 실험군 분리

골관절염을 유발하지 않은 정상군(Normal), MIA로 골관절염 유도 후 증류수를 경구 투여한 대조군(Control), MIA로 골관절염을 유도한 후 indomethacin 5 mg/kg을 투여한 군(Indo), MIA로 골관절염 유도 후 附子湯 100 mg/kg을 투여한 군(BJTL), MIA로 골관절염 유도 후 附子湯 200 mg/kg을 투여한 군(BJTH)으로 총 5개의 실험군으로 분리했으며 각 군당 7마리씩 배속시켰다. Indomethacin과 附子湯은 증류수에 녹인 후 2주 동안 매일 같은 시간 경구 투여하였다.

### 4) MIA에 의한 골관절염 유발

마취제인 zoletile mixture 3.5 mg/kg을 복강 투여로 쥐를 마취했다. 오른쪽 슬관절의 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염을 유도하기 위하여 MIA를 insulin 주사기(BD 31 G; BD Medical-Diabetes Care, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 우측 무릎의 관절강 내에 50 µL (80 mg/mL)씩 투여했다. MIA 투여 일주일 후에 골관절염이 유발되었는지 확인하여 골관절염이 유발된 쥐를 선별하여 사용했다.

### 5) 체중, 식이섭취량, 식이효율 측정

쥐의 체중은 전자체중계로 2일에 1번씩 같은 시간과 조건에서 측정하였고, 실험 종료일 체중을 잰 후 실험 시작 전 체중을 빼서 체중 증가량을 산출했다. 식이섭취량 계산은 2일간 제공된 식이량을 2일간 섭취하고 남은 식이량을 빼 후 각 실험군의 하루 섭취량을 계산했다. 또한 각 쥐의 체중 증가량을 동일 사육기간의 식이섭취량으로 나눠서 식이효율(%; food efficiency ratio, FER)을 산출했다.

(1) 체중(body weight, BW)

① 체중의 변화: 2일 간격으로 1회 측정하였다. 오전 동일한 시간에 체중을 측정하여 기록하였다.

② 총 체중 증가량(weight gain): Final BW (g) - Initial BW (g)

(2) 식이효율(FER)

식이효율(%) = 총 체중 증가량/총 식이 섭취량 × 100

### 6) 뒷다리 체중 부하 측정

附子湯의 경구 투여는 오전에, 뒷다리 체중 부하는 오후에 측정했다. 측정일은 附子湯을 경구 투여한 1주일 후와 2주일 후에 각각 진행했다. 체중부하측정기를 이용하여 자연스럽게 서 있을 때 왼쪽과 오른쪽 발의 무게를 측정했다. MIA에 의해 골관절염이 유도되면 쥐는 MIA를 주사하지 않은 왼쪽 다리에 체중을 지지하여 측정기(tester)의 거치대(holder) 위에 서 있게 된다. 이때 좌측과 우측 각각의 발무게(g)를 측정 산출했다. 실험의 결과는 골관절염이 유발된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량에 대하여 왼쪽 뒷다리(정상 뒷다리)의 체중 부하량을 측정한 후 체중 부하 비율을 계산하고, 정상군을 100으로 했을 경우 각 실험군의 체중 부하 비율을 계산하여 mean (%) ± standard deviation (SD)로 나타내었다.

$$f \text{ 체중부하비율} = \frac{\text{정상 뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}}$$

$$ff \text{ 상대적 체중부하} = \frac{\text{각군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의 체중 부하 비율}} \times 100$$

### 7) 단백질 발현량 분석

관절조직의 세포질을 획득하여 단백질 발현량 분석을 위해 다음의 시약 (5 mM Tris-HCl [pH 7.5]/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1.5 M sucrose/15 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM Tris-HCl [pH 7.4])을 잘 섞은 후 0.1 M DTT와 단백분해효소억제제(protease inhibitor)를 추가하고, buffer A를 넣은 후 조직연마기(tissue grinder)로 잘 분쇄하여 NP-40 (10%) 용액을 추가했다. 20분간 얼음 위에 방치한 후 2분간 12,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액(세포질 함유)을 분리했다. 세포핵을 얻기 위해 NP-40 (10%)이 추가된 buffer A에 2회 잘 씻어내고 100 μL의 buffer C (50 mM HEPES/50 mM KCl/1 mM DTT/0.3 mM NaCl/0.1 mM EDTA/0.1 mM PMSF/10% glycerol)를 추가하여 다시 부유시켜 vortex를 10분 간격으로 3회 실시했다. 10분 간격으로 12,000 rpm (4°C)으로 원심 분리한 후 핵이 함유된 상층액을 얻어 -80°C에서 핵과 세포질을 냉동 보관했다. 관절조직 세포질의 NOX4, p22<sup>phox</sup>, COX-2, p-IkBα, iNOS, TNF-α, HO-1, IL-1β, IL-6, SOD, β-actin, 핵의 NF-κBp65, histone, Nrf2 단백질 발현을 실험하기 위하여 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 만든 후 10-12 μg의 단백질을 전기영동하여 acrylamide gel에서 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)으로 이동시켰다. 전기 영동된 membrane에 얼고자 하는 1차 항체를 처리하였으며, 4°C에서 하룻밤 경과(overnight)시킨 후 phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T)로 8분마다 6회 행구고, 1차 항체에 적합한 2차 항체(PBS-T로 1:5,000으로 희석)를 사용하여 상온에서 1시간 30분간 반응시킨 다음 PBS-T로 8분마다 5회 세척했다. 또한 ECL solution (GE Healthcare)에 노출시키고, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 원하는 단백질 발현을 확인하고 나서, 발현된 band를 정량하기 위해 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 이용했다. 각 군 단백질 수준은 정상군 단백질 수준으로 나눈 후 상대적 비로 나타냈다(represented as 1).

### 8) 병리조직 분석

오른쪽 슬관절 부위를 절단하여 포르말린 10% 용액에 넣어 관절조직을 탈회한다. 방사선기법(radiographic technique)을 이용하여 탈회 유무를 평가한 후 파라핀

왁스에 관절조직을 넣고 고정시킨 다음 관상면 절단 (coronal section)을 진행했다. 탈회 과정을 거친 조직을 파라핀으로 잘 고정하여 7  $\mu\text{m}$ 로 자르고 hematoxylin & eosin (H&E), safranin-O 염색을 시행하였다. 염색된 조직은 현미경을 이용해 상태를 관찰했다. H&E 염색 결과는 조직의 염증 유무나 활막 세포의 증식과 염증 세포의 조직 침윤 여부를 관찰할 수 있으며 safranin-O는 proteoglycan층을 염색하여 연골의 손상을 관찰할 수 있다.

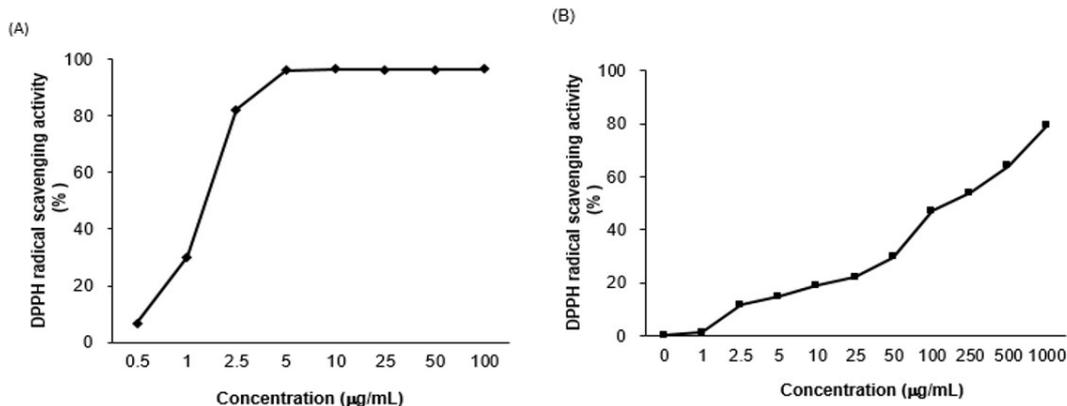
### 9) 통계처리

모든 실험 수치는 mean $\pm$ SD 및 mean $\pm$ standard error of measurement로 나타냈으며, SPSS program Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)으로 one-way analysis of variance 검정을 하였으며, 통계적 유의성 평가는 Dunnett's multiple comparison test를 실시했다. 정상군과 대조군 그리고 대조군과 약물 처리군 사이에 유의성은 p-value<0.05인 경우 유의성이 있는 경우로 판정했다.

## 결과»»»»

### 1. DPPH 라디칼 소거능

*Buja-tang*의 항산화 활성을 분석하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과, 용량 의존적으로 DPPH 소거능이 증가했다. DPPH 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 166.99 $\pm$ 0.56  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Scavenging activity of *Buja-tang* on DPPH free radical. (A) DPPH free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) DPPH free radical scavenging activity of *Buja-tang*. DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. All values are mean $\pm$ standard error of measurement of triplicate experiments.

### 2. ABTS 라디칼 소거능

*Buja-tang*의 항산화 활성을 분석하기 위해 ABTS 소거능을 분석한 결과, 용량 의존적으로 ABTS 소거능이 증가했다. ABTS 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 237.86 $\pm$ 0.50  $\mu\text{g/mL}$ 이다(Fig. 2).

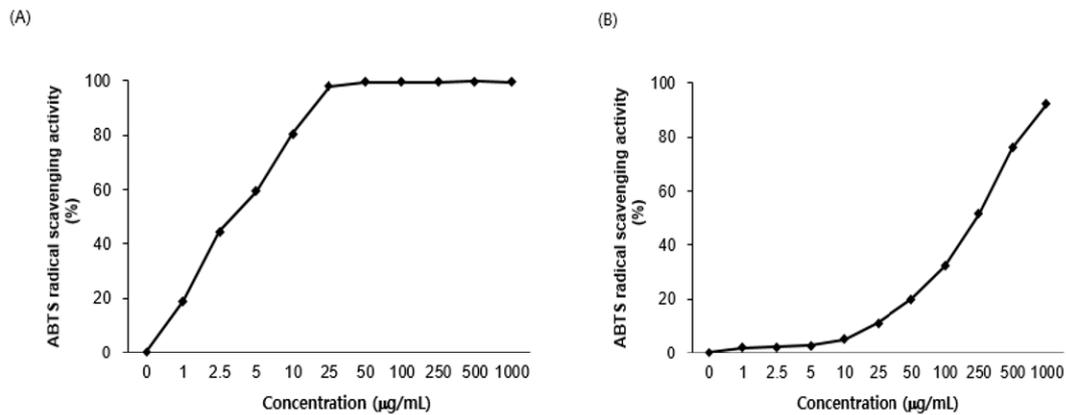
### 3. 체중 및 식이효율 변화

군 분리 때부터 실험종료 기간까지 측정된 체중 변화 (g)는 정상군 43.8 $\pm$ 10.1, 대조군 46.4 $\pm$ 6.2, Indo 49.8 $\pm$ 12.8, BJTL 52.0 $\pm$ 3.6, BJTH 44.0 $\pm$ 3.1로 나타났다. MIA 유발 후 14일간의 체중 측정에서 모든 실험군에서 체중이 증가했으며, 실험군 간의 유의성은 없었다(Table II).

식이효율은 정상군 20.2 $\pm$ 4.7, 대조군 21.4 $\pm$ 2.9, Indo 22.9 $\pm$ 5.9, BJTL 24.0 $\pm$ 1.7, BJTH 20.3 $\pm$ 1.4으로 나타났고 실험군 간의 유의성은 없었다(Table III).

### 4. 뒷다리 체중 부하의 변화

정상군의 뒷다리 체중 부하 비율을 100으로 해서 상대적 뒷다리 체중 부하 변화를 평가한 결과, MIA 투여 7일 후 대조군 207.16 $\pm$ 30.30, Indo 167.34 $\pm$ 8.52, BJTL 177.31 $\pm$ 22.44, BJTH 131.59 $\pm$ 9.75로 나타났으며 정상군과 대조군에서만 유의적 차이를 보였다. 또한 14일에는 대조군 171.89 $\pm$ 9.00, Indo 155.81 $\pm$ 6.09, BJTL 163.81 $\pm$ 10.87, BJTH 151.97 $\pm$ 13.51로 나타났으며 정상군과 대조군에



**Fig. 2.** Scavenging activity of *Buja-tang* on ABTS free radical. (A) ABTS free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) ABTS free radical scavenging activity of *Buja-tang*. ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). All values are mean±standard error of measurement of triplicate experiments.

**Table II.** Body Weight Change of the Experimental Groups

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight change (g)
Normal	311.6±5.7	348.9±7.8	43.8±10.1
Control	301.1±5.6	358.7±4.9	46.4±6.2
Indo	297.3±4.4	347.1±13.4	49.8±12.8
BJTL	296.3±8.7	354.3±10.0	52.0±3.6
BJTH	303.1±9.6	347.1±8.1	44.0±3.1

Results are mean±standard deviation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats.

MIA: monosodium iodoacetate.

**Table III.** Food Intakes, Body Weight Change and Food Efficiency

Group	Food intakes (g/day)	Body weight change (g/day)	Food efficiency ratio (%)
Normal	24.1±3.7	4.9±1.1	20.2±4.7
Control	24.4±1.1	5.2±0.7	21.4±2.9
Indo	21.3±1.0	5.5±1.4	22.9±5.9
BJTL	27.3±3.2	5.8±0.4	24.0±1.7
BJTH	23.0±0.8	4.9±0.3	20.3±1.4

Results are mean±standard deviation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats.

MIA: monosodium iodoacetate.

서만 유의한 차이를 보였다. 하지만 대조군에 비해 약 물처리군 모두에서 뒷다리 체중 부하가 감소되었으나 유의성은 없었다(Table IV).

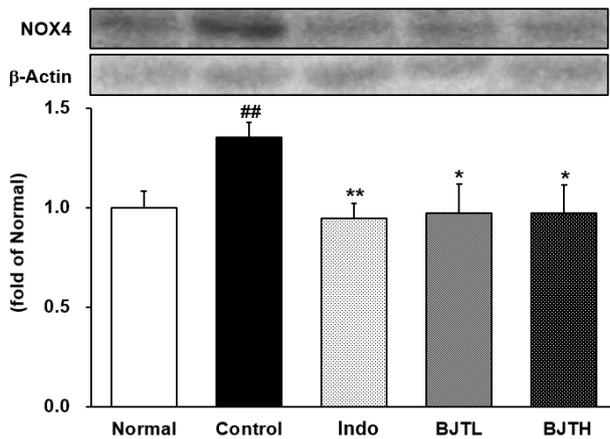
**Table IV.** The Relative Changes of Hind Paw Weight Distribution

Group	0 day	7 days	14 days
Normal	100±6.44	100±2.64	100±4.77
Control	234.36±41.36 <sup>###</sup>	207.16±30.30 <sup>###</sup>	171.89±9.0 <sup>###</sup>
Indo	217.31±25.95	167.34±8.52	155.81±6.09
BJTL	226.37±19.40	177.31±22.44	163.81±10.87
BJTH	226.26±20.23	131.59±9.75	151.97±13.51

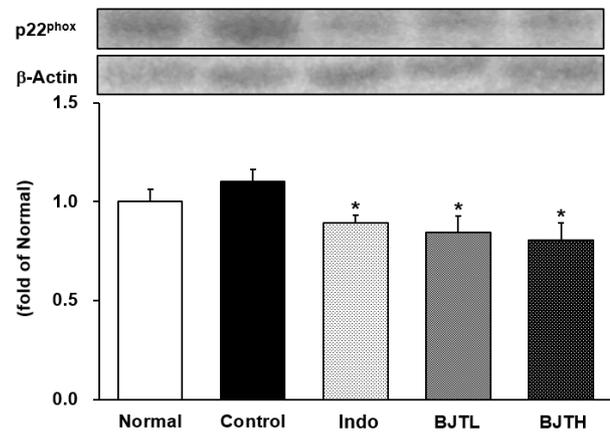
Results are mean±standard deviation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats.

<sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001 vs. Normal.



**Fig. 3.** Effects of *Buja-tang* on NOX4 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. NOX4: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). <sup>###</sup>p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control.



**Fig. 4.** Effects of *Buja-tang* on p22<sup>phox</sup> expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05 vs. Control.

## 5. 관절조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 분석

### 1) NOX4 분석

NOX4의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.08, 대조군 1.35±0.07, Indo 0.95±0.08, BJTL 0.97±0.15, BJTH 0.97±0.14로 나타나서 대조군에 비해 Indo (p<0.01), BJTL (p<0.05), BJTH (p<0.05)에서 유의하게 감소했다 (Fig. 3).

### 2) p22<sup>phox</sup> 분석

p22<sup>phox</sup>의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.06, 대조군 1.10±0.06, Indo 0.89±0.04, BJTL 0.84±0.08, BJTH 0.81±0.09로 나타나서, 대조군에 비해 Indo (p<0.05), BJTL (p<0.05), BJTH (p<0.05)에서 유의하게 감소했다 (Fig. 4).

## 6. 관절조직 내 항산화 단백질 분석

### 1) Nrf2 분석

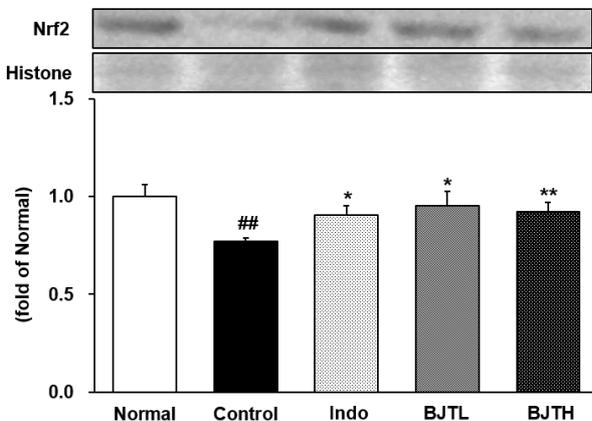
Nrf2의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.06, 대조군 0.77±0.02, Indo 0.91±0.05, BJTL 0.95±0.08, BJTH 0.92±0.05로 나타나서 대조군에 비해 Indo (p<0.05), BJTL (p<0.05), BJTH (p<0.01)에서 유의하게 증가했다(Fig. 5).

### 2) HO-1 분석

HO-1의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.10, 대조군 0.55±0.05, Indo 0.82±0.12, BJTL 0.64±0.07, BJTH 0.84±0.10으로 나타나서 대조군에 비해 BJTH (p<0.05)에서 유의하게 증가했다(Fig. 6).

### 3) SOD 분석

SOD의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.08, 대조군 0.71±0.03, Indo 1.03±0.08, BJTL 0.94±0.20, BJTH 0.91±0.08로 나타나서 대조군에 비해 Indo (p<0.01), BJTH (p<0.05)에서 유의하게 증가했다(Fig. 7).

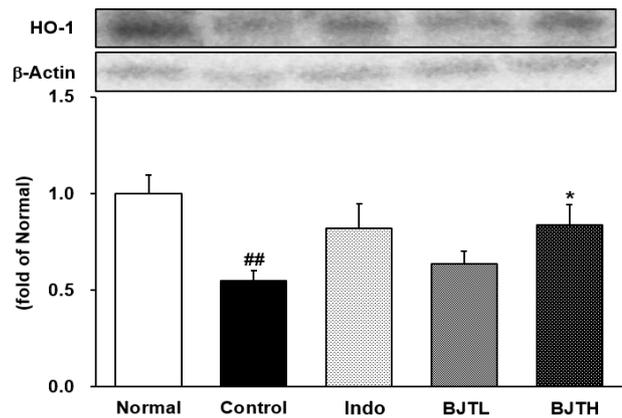


**Fig. 5.** Effects of *Buja-tang* on Nrf2 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. Nrf2: nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). ##p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control.

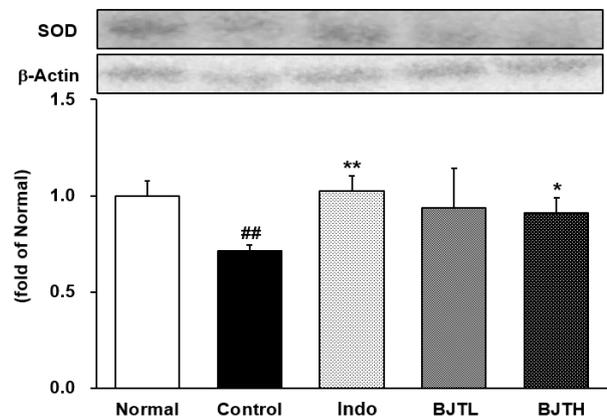
## 7. 관절조직 내 염증성 단백질 분석

### 1) p-IκBα 분석

p-IκBα의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.02, 대



**Fig. 6.** Effects of *Buja-tang* on HO-1 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. HO-1: heme oxygenase-1, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). ##p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05 vs. Control.



**Fig. 7.** Effects of *Buja-tang* on SOD expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. SOD: superoxide dismutase, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). ##p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control.

조군  $1.25 \pm 0.10$ , Indo  $0.89 \pm 0.07$ , BJTL  $0.95 \pm 0.06$  BJTH  $0.95 \pm 0.06$ 으로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p < 0.05$ ), BJTL ( $p < 0.05$ ), BJTH ( $p < 0.05$ )에서 유의하게 감소했다 (Fig. 8).

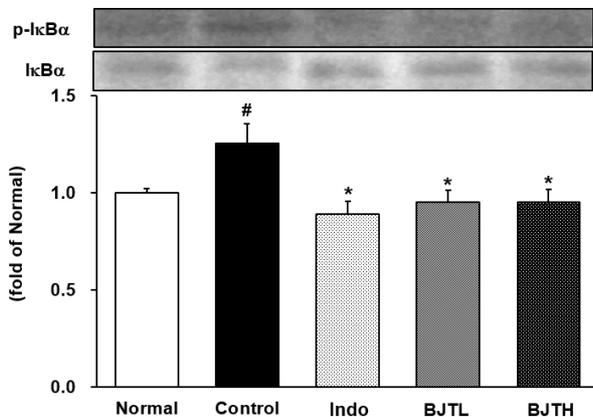
## 2) NF- $\kappa$ Bp65 분석

NF- $\kappa$ Bp65의 발현을 확인한 결과, 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $1.42 \pm 0.05$ , Indo  $1.05 \pm 0.06$ , BJTL  $1.23 \pm 0.06$ , BJTH  $1.23 \pm 0.05$ 로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p < 0.001$ ), BJTL ( $p < 0.05$ ), BJTH ( $p < 0.05$ )에서 유의하게 감소했다 (Fig. 9).

## 8. 염증성 매개인자에 미치는 영향

### 1) COX-2 분석

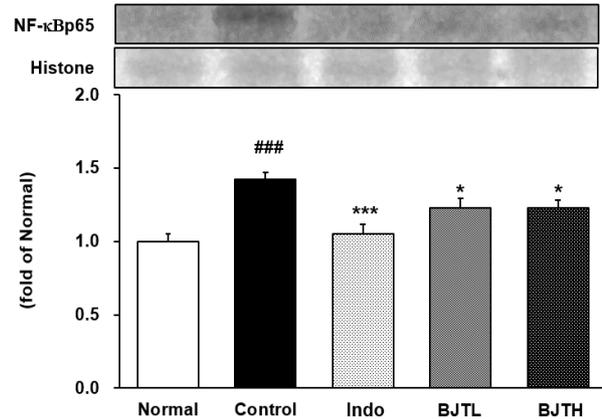
COX-2의 발현을 확인한 결과, 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $1.47 \pm 0.11$ , Indo  $1.03 \pm 0.14$ , BJTL  $1.04 \pm 0.10$ , BJTH  $1.04 \pm 0.11$ 로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p < 0.05$ ), BJTL ( $p < 0.05$ ), BJTH ( $p < 0.05$ )에서 유의하게 감소했다. Indomethacin과 附子湯의 처리는 COX-2의 발현을 정상 수준까지 감소시켰다(Fig. 10).



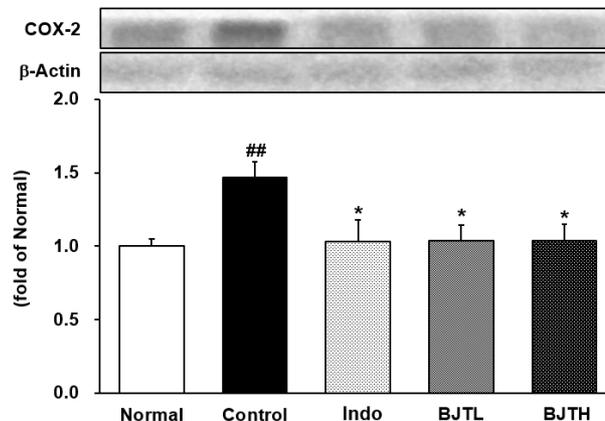
**Fig. 8.** Effects of *Buja-tang* on p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. p-I $\kappa$ B $\alpha$ : phosphorylated inhibitor of  $\kappa$ B $\alpha$ , MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean $\pm$ standard deviation (n=7/group). <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. Normal and <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. Control.

## 2) iNOS 분석

iNOS의 발현을 확인한 결과, 정상군  $1.00 \pm 0.11$ , 대조군  $1.43 \pm 0.09$ , Indo  $0.94 \pm 0.14$ , BJTL  $0.96 \pm 0.15$ , BJTH



**Fig. 9.** Effects of *Buja-tang* on NF- $\kappa$ Bp65 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. NF- $\kappa$ Bp65: nuclear factor-kappa B p65, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean $\pm$ standard deviation (n=7/group). <sup>###</sup> $p < 0.001$  vs. Normal and <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs. Control.



**Fig. 10.** Effects of *Buja-tang* on COX-2 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. COX-2: cyclooxygenase 2, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean $\pm$ standard deviation (n=7/group). <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. Normal and <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. Control.

0.92±0.16으로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p<0.05$ ), BJTL ( $p<0.05$ ), BJTH ( $p<0.05$ )에서 유의하게 감소했다. Indo, BJTL, BJTH에서 iNOS의 발현이 정상군보다 더 낮게 나타났다(Fig. 11).

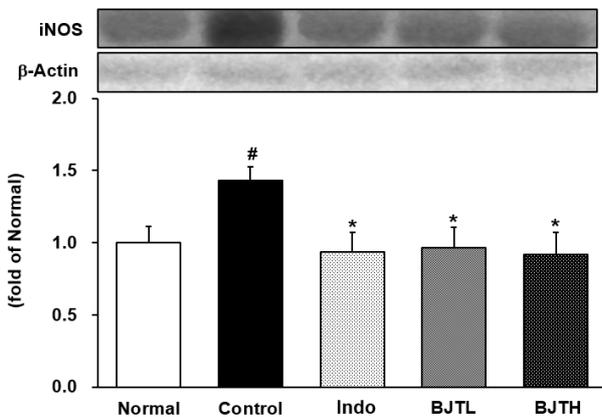
## 9. 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향

### 1) TNF- $\alpha$ 분석

TNF- $\alpha$ 의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.05, 대조군 1.14±0.01, Indo 0.97±0.06, BJTL 0.89±0.07, BJTH 0.88±0.08로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p<0.05$ ), BJTL ( $p<0.01$ ), BJTH ( $p<0.01$ )에서 유의하게 감소했다. Indo, BJTL, BJTH에서 TNF- $\alpha$ 의 발현이 정상군보다 더 낮게 나타났다(Fig. 12).

### 2) IL-6 분석

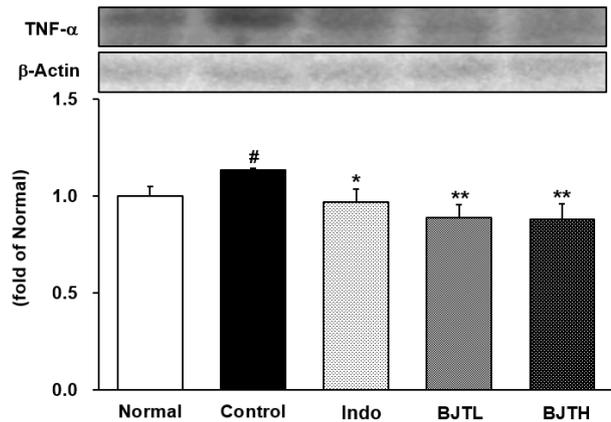
IL-6의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.09, 대조군 1.33±0.11, Indo 1.07±0.10, BJTL 0.90±0.13, BJTH 0.97±0.13으로 나타나서 대조군에 비해 BJTL ( $p<0.05$ ), BJTH ( $p<0.05$ )에서 유의하게 감소했다. BJTL, BJTH에서 IL-6의 발현이 정상군보다 더 낮게 나타났다(Fig. 13).



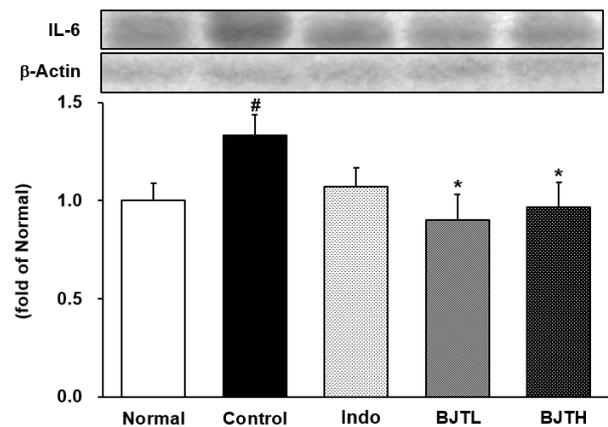
**Fig. 11.** Effects of *Buja-tang* on iNOS expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. iNOS: inducible nitric oxide synthase, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation ( $n=7$ /group). # $p<0.05$  vs. Normal and \* $p<0.05$  vs. Control.

### 3) IL-1 $\beta$ 분석

IL-1 $\beta$ 의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.07, 대조군 1.27±0.09, Indo 0.95±0.06, BJTL 0.86±0.10, BJTH

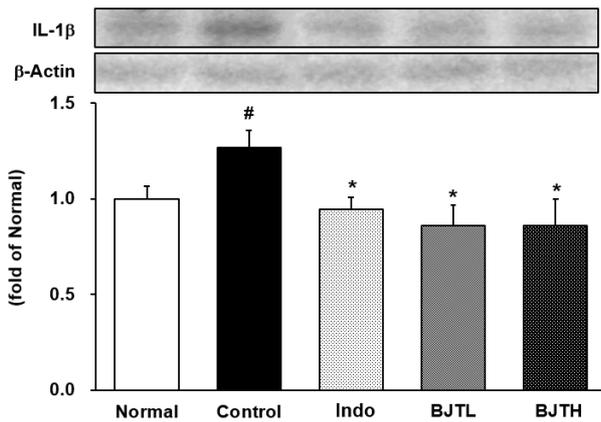


**Fig. 12.** Effects of *Buja-tang* on TNF- $\alpha$  expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation ( $n=7$ /group). # $p<0.05$  vs. Normal and \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs. Control.



**Fig. 13.** Effects of *Buja-tang* on IL-6 expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. IL-6: interleukin-6, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation ( $n=7$ /group). # $p<0.05$  vs. Normal and \* $p<0.05$  vs. Control.

0.86±0.14로 나타나서 대조군에 비해 Indo ( $p<0.05$ ), BJTL ( $p<0.01$ ), BJTH ( $p<0.05$ )에서 유의하게 감소했다. Indo, BJTL, BJTH에서 IL-1 $\beta$ 의 발현이 정상군보다 더 낮게 나타났다(Fig. 14).



**Fig. 14.** Effects of *Buja-tang* on IL-1 $\beta$  expression. Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. IL-1 $\beta$ : interleukin-1beta, MIA: monosodium iodoacetate. Results are mean±standard deviation (n=7/group). # $p<0.05$  vs. Normal and \* $p<0.05$  vs. Control.

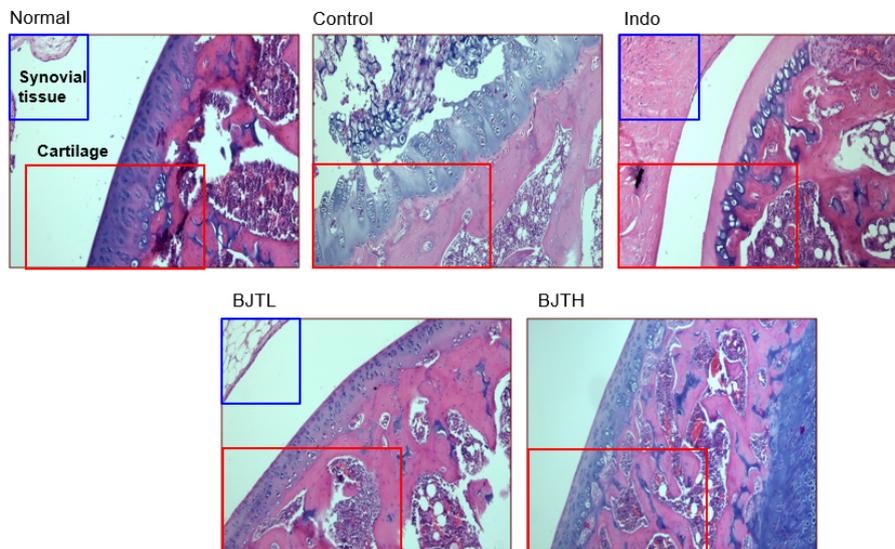
## 10. 조직병리학적 변화 관찰

### 1) H&E staining

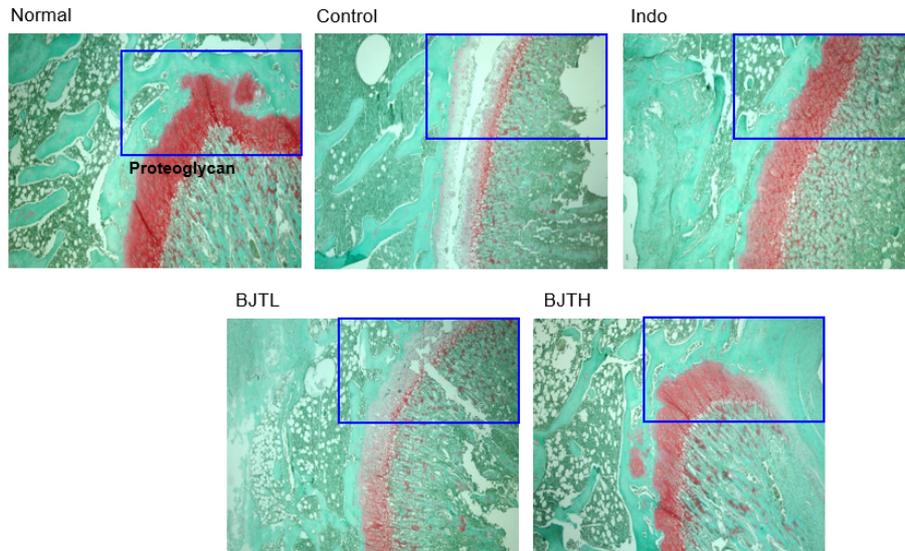
손상된 연골의 회복 정도를 관찰하기 위하여 H&E 염색한 결과, 정상군에서는 활막 조직과 연골은 정상이었지만, 대조군에서는 골관절염으로 인하여 연골 표면이 불규칙했으며 활막과 연골이 변성되고 변형이 현저하게 나타남을 확인하였다. Indo와 BJTL, BJTH의 활막과 연골은 대조군에 비하여 정상에 가까웠기 때문에 조직 손상의 억제 효과가 효과적으로 나타났다(Fig. 15).

### 2) Safranin-O staining

관절 조직의 proteoglycan 소실 정도를 관찰하기 위해 safranin-O 염색을 실시한 결과, 대조군에서는 골관절염이 유발되어 관절 조직이 변형되었고, proteoglycan의 대부분이 파괴되어 연골의 형태학적 변화가 발생했다. 반면 Indo와 BJTL, BJTH에서는 대조군에 비하여 관절의 조직 변형 및 proteoglycan 소실이 모두 억제되는 것으로 관찰되었다. 또한 BJTL보다는 BJTH에서 proteoglycan 파괴를 더 억제함을 보여주었다(Fig. 16).



**Fig. 15.** Histological observation on joint (hematoxylin & eosin staining, x100). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. MIA: monosodium iodoacetate.



**Fig. 16.** Histological observation on joint (Safranin-O staining, x100). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, BJTL: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 100 mg/kg treated rats, BJTH: MIA-induced osteoarthritis and *Buja-tang* 200 mg/kg treated rats. MIA: monosodium iodoacetate.

## 고찰»»»»»

골관절염은 주로 무릎과 엉덩이, 손과 척추 등에 노화로 인한 관절 내 연골과 뼈의 퇴행성 변화로 관절 조직의 손상, 통증, 강직, 운동 제한을 초래하며 심한 경우 관절 대체가 필요하여 낮은 삶의 질과 높은 질병부담과 관련이 있는 질환이다<sup>15)</sup>. 2013년 국민건강영양조사에서 보고한 50세 이상 성인의 골관절염 유병률은 12.5%(남자 5.1%, 여자 18.9%)로 연령이 증가할수록 유병률도 높아졌다<sup>16)</sup>.

골관절염의 병리학적 필수 소견은 관절 연골의 손실로, 초기에는 국소적으로 관절에 일정하지 않게 존재한다. 연골하 골판이 두꺼워지며 경화가 동반되고, 관절 변연부에는 골극이 생성되어 경미한 활막염, 관절을 이어주는 근육 약화, 관절낭의 신전 등이 동반된다<sup>17)</sup>. 연골 항상성의 유지를 도와주는 연골세포의 병적 변화와 사멸로 인하여 proteoglycan, aggrecan, collagen 등 세포외기질이 감소하면서 연골의 기본적인 구조가 파괴되어 관절이 부하를 이겨내지 못하게 된다<sup>18)</sup>. 이와 같은 연골의 파괴 과정에 IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌다<sup>19)</sup>.

본 연구에 사용된 附子湯은 附子, 人蔘, 白芍藥, 桂枝,

白茯苓, 甘草, 白朮, 生薑으로 구성되어 있다. 이 중 附子는 祛寒藥에 속하며 風寒濕痺, 脚氣水腫 등을 치료하며<sup>20)</sup>, 관절 변형 및 골밀도 감소를 방지한다고 보고되었다<sup>4)</sup>. 桂枝는 發散風寒藥으로 附子和 配合하여 風寒濕痺와 邪氣가 經絡에 阻滯하여 된 關節痠痛을 치료하며<sup>20)</sup>, IL-6와 TNF- $\alpha$ 를 감소시키고, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해와 extracellular regulated kinase1/2, c-JunN-terminal kinase, p38의 활성화 억제를 하여 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 白茯苓은 利水退腫藥으로 인삼, 백출 등을 배합하여 수종창만과 소변불리를 치료하며<sup>20)</sup> 항산화작용, 이뇨, 억균작용, 장관이완작용, 면역증강작용, 항종양작용, 항암작용, 항염작용 등의 효과가 보고되었다<sup>6)</sup>. 人蔘은 補氣藥에 속하며 大補元氣, 固脫生津의 효능을 가지고 있으며<sup>20)</sup> IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 cytokine을 감소시키고 항산화 효과가 보고되었다<sup>7,8)</sup>. 白芍藥은 補血藥으로 분류되며 養血柔肝 緩中止痛 斂陰收汗의 효능이 있으며<sup>20)</sup>, NO 생성 억제와 T-cell 증식 억제 등 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>9)</sup>. 甘草는 補氣藥으로 生用하면 解毒하는 효능이 있고, 甘緩한 性味는 緩急止痛하는 효능이 있으며<sup>20)</sup>, 대식세포주에서 항염증효과가 있다고 보고되었다<sup>10)</sup>. 白朮은 補氣藥으로 健脾益氣, 燥濕利水 효능이 있으며<sup>20)</sup>, 혈청 내 TNF- $\alpha$ 와 항-콜라겐 항체를 유의하게 감소시켜

서 콜라겐으로 유발한 관절염 마우스에서 관절염을 개선시키는 효과가 있다고 보고되었다<sup>11)</sup>.

이처럼 附子湯을 구성하는 각각의 본초는 면역반응 조절, 항염증, 항산화 등의 효과가 있는 것으로 실험으로 확인되어 각 본초의 복합제인 附子湯 또한 항산화, 항염증 효과가 있을 것으로 예상되었다. 또한 MIA로 유발한 골관절염 모델은 통증, 기능장애, 연골손상 등이 실제 골관절염과 유사하다<sup>21)</sup>. 그러므로 본 연구에서는 MIA를 투입하여 골관절염을 유발한 rat 모델에서 附子湯을 경구 투여하여 항산화력 측정, 체중변화 및 식이효율 분석, 뒷다리 체중부하 검사, 산화적 스트레스 관련 단백질 분석, 항산화 단백질 분석, 염증성 단백질 분석, 염증성 매개인자에 미치는 영향, 염증성 cytokine 발현에 미치는 영향, 조직병리학적 변화에 미치는 영향 등에 대해 알아보려 하였다.

본 실험에서 사용된 附子湯의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 활성 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 이 두 가지 측정법은 항산화력을 측정하는 가장 기본이 되는 시험법으로 잘 알려져 있다. DPPH 및 ABTS 소거능을 IC<sub>50</sub>으로 각각 나타내었을 때 166.99±0.56 µg/mL, 237.86±0.50 µg/mL로 나타났다. 이러한 점으로 보아 附子湯은 농도 의존적으로 항산화력이 증가한다고 볼 수 있다.

附子湯의 안전성을 확인하기 위하여 체중 변화, 식이효율을 측정하였다. 체중은 모든 군에서 증가하였고, 식이효율은 유의한 차이가 없었다. 이러한 점으로 보아 附子湯은 실험에서 사용된 rat에게 식이적인 부작용이 나타날 영향이 없다고 할 수 있다.

골관절염이 유발된 rat은 유발된 다리로 체중을 신지 않는 특징을 가진다<sup>22)</sup>. 이에 골관절염이 유발한 rat의 통증 정도를 확인하기 위해서 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정하였다. MIA 투여 7일 후와 14일 후에 대조군에 비해서 뒷다리 체중부하가 약물 처리군 모두에서 감소되었으나 유의성은 없었다. 체중부하가 감소되는 경향을 보아 附子湯은 rat의 통증을 감소시켰다고 볼 수 있다.

O<sub>2</sub>·를 만들어 내는 효소인 NADPH oxidase는 p22<sup>phox</sup>, NOX4, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> 등으로 구성되어 있고, 이 중에서 p22<sup>phox</sup>는 혈관에서의 주된 산화 스트레스를 발생시키는 과산화음이온을 생성시킨다<sup>23)</sup>. NOX4는 세포막에

자리잡고 있는 p22<sup>phox</sup>의 조절로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 과잉 생성하고, 동시에 미토콘드리아의 전자전달계에 의하여 과잉 생산된 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시켜 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있다<sup>24)</sup>. 본 실험에서 측정된 결과 NOX4의 발현은 *Buja-tang* 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, p22<sup>phox</sup>의 발현 또한 *Buja-tang* 처리군에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 이러한 점으로 보아 附子湯은 관절 조직의 산화적 스트레스 단백질 중 p22<sup>phox</sup> 및 NOX4를 억제하여 항산화 효과가 있을 것으로 생각된다.

Nuclear factor erythroid 2란 항산화단백질의 일종으로 산화적 스트레스나 염증반응과 같은 병리적 상황에서 증가하게 되며, 다양한 항산화전자의 전사를 통해 세포를 산화적 스트레스로부터 보호한다고 보고됐다<sup>25,26)</sup>. Heme oxygenase에는 HO-1, HO-2, HO-3 등이 있는데 그 중에서 특히 HO-1은 스트레스에 반응하는 효소로 강력한 항염증, 항산화 효과와 더불어 세포를 보호하는 효과가 있다고 알려져 있다<sup>27)</sup>. 혈청 중 산화적 스트레스의 지표인 reactive oxygen species (ROS)는 호기성 세포 대사 과정에서 생성되고, 세포 내 표적에게 생물학적으로 미치는 영향은 농도에 따라서 다른데, 농도가 증가하면 돌연변이, 세포 사멸, 발암 요인, 염색체 이상 등이 ROS 유발 손상을 발생하기도 한다. 포유류 세포 내에 함유된 주요한 항산화 효소 중 하나는 SOD이다<sup>28)</sup>. 간 조직 내 항산화와 관련된 단백질인 SOD는 초과산화이온(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 산소와 과산화수소로 바꿔 주는 촉매작용을 하는 효소이며, 산소에 노출되는 대다수의 세포에서 항산화 방어기작을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 Nrf2는 대조군과 비교하여 약물 처리군에서 유의하게 증가하였다. HO-1은 대조군과 비교하여 BJTH에서 유의하게 증가하였다. SOD는 대조군과 비교하여 BJTH에서 유의하게 증가하였다. 이러한 결과에 따라 附子湯은 관절 조직 내에서 항산화 효과가 있을 것으로 생각한다.

NF-κB는 보통의 상태에서 inhibitory kappa B와 결합되어 세포질 내에서 불활성 상태로 있으나, TNF-α 등의 자극으로 비활성 상태로 있는 inhibitory kappa B kinase를 활성화상태로 변화시켜 인산화 되어 있는 IκBα가 분해되면 p65 등으로 대표되는 단백질들이 세포핵 안으로 이동하여 전사인자로서의 역할을 수행한다<sup>29,30)</sup>. 동시에

핵에서 전사가 이루어져 염증성 매개인자로 알려진 iNOS와 COX-2, 염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등을 분비한다. 본 실험에서 NF- $\kappa$ B와 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현은 대조군과 비교하여 모든 약물 처리군에서 유의하게 감소하였다. 이러한 결과에 따라 附子湯은 관절 조직 내에서 항염증 효과가 있을 것으로 생각한다.

Cyclooxygenase란 COX-1과 COX-2로 이루어져 있으며 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 효소이다. 그 중에서 COX-2는 염증과 관계되는 활막 세포, 대식 세포, 단핵구 세포에서 높은 비율로 발현되며 COX-2를 선택적 억제제가 가능하다면, 이론적으로 혈소판 기능을 저해하지 않고 위장관 점막의 세포를 보호하면서 항염증작용을 한다고 본다<sup>31)</sup>. iNOS는 질소를 과량 생성하여 연골세포에서 염증성 cytokine의 분비 및 이화작용을 촉진시키는 효소이며 iNOS에 의하여 과량 생성된 질소는 proteoglycan과 collagen의 합성을 억제하며 기질분해효소로 작용하여 연골세포의 염증 반응을 조장하고 연골세포를 사멸시키기도 한다<sup>32,33)</sup>. 또한 iNOS에 의해 질소가 과량 생성된다면 관절 조직에 산화적 스트레스를 미치는 ROS가 함께 생성된다<sup>34)</sup>. 본 실험에서 iNOS와 COX-2의 발현은 대조군과 비교하여 모든 약물 처리군에서 유의하게 감소하였다. 특히 Indo와 BJTL, BJTH에서 COX-2의 발현을 정상 수준까지 감소시키고 iNOS의 발현을 정상군보다 더 낮게 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과에 따라 附子湯은 COX-2와 iNOS의 발현을 감소시켜 염증 매개를 억제할 것으로 생각한다.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6는 이화작용을 일으키는 cytokine의 일종으로, 골관절염 환자들에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 가 연골세포들에 의하여 발현되며 matrix metalloproteinase, aggrecanase, iNOS, COX-2 등을 유도하여 tissue inhibitor of metalloproteinase 등을 억제하여 이화작용을 주도하고 IL-8, IL-6, nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> 등의 생산을 통해 염증 반응을 주도한다<sup>2)</sup>. 본 실험에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현은 BJTL, BJTH에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과로 보아 附子湯은 염증성 cytokine 발현을 억제시켜 항염증 효과를 보일 것으로 생각한다.

골관절염의 조직병리학적 관찰을 위해 H&E과 safranin-O 염색을 시행하였다. H&E 염색은 호산성인 eo-

sin과 호염기성인 hematoxylin으로 proteoglycan, 세포질, 핵 등을 염색시키는 방법이며, safranin-O는 양이온성 염색소로 chondroitin sulfate나 keratan sulfate 등의 음이온과 결합하여 연골에 분포하는 proteoglycan의 양에 비례해서 오렌지색 또는 적색으로 염색시켜 연골 내의 proteoglycan 농도 변화를 대략적으로 추정하는데 도움을 준다<sup>35)</sup>. H&E 염색 결과에서 대조군은 활막 조직과 연골의 변형 및 변성이 현저하게 보였으나 BJTL, BJTH와 Indo에서 대조군과 비교하여 활막 및 연골 조직에서 손상이 효과적으로 억제되는 것으로 보였다. Safranin-O 염색에서는 대조군의 proteoglycan은 대부분 파괴되고 관절조직이 변형되었으나 BJTL, BJTH와 Indo에서 대조군과 비교하여 proteoglycan의 소실이 억제되고 관절조직의 변형도 억제되는 것으로 보였다.

본 실험에서 附子湯과 양약의 효과를 비교하기 위하여 사용한 indomethacin은 비교적 많이 사용되고 있는 비스테로이드성 소염진통제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 중 하나로, prostaglandin을 생성하는 COX 효소를 억제하는데 다양한 생리작용을 매개하는 COX-1 마저 억제해 위장관 합병증이 흔히 발생한다<sup>36)</sup>. 그 외에도 피부발진, 청각장애 등의 부작용이 보고되고 있어<sup>37)</sup> 신중하게 투여해야 하는 약물 중의 하나이다.

附子湯과 indomethacin의 효과를 본 실험을 통해 비교해 보았을 때 두 약물은 관절조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질인 NOX4, p22<sup>phox</sup>와 관절조직 내 항산화 단백질인 Nrf2와 SOD를 유의하게 감소시켰다. 관절조직 내 염증성 단백질인 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ Bp65와 염증성 매개인자인 iNOS, COX-2 및 염증 cytokine인 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 유의하게 감소시켰다. 또한 H&E과 safranin-O 염색에서도 조직 손상 억제 및 proteoglycan 파괴 억제를 보였다.

두 약물의 효과가 비슷하다면 양약의 부작용을 보완할 수 있는 附子湯의 투여가 더 좋은 치료라 생각한다. 또한 附子湯 고농도 투여군이 저농도 투여군보다 효과가 더 있을 것으로 예상하였으나, 실제로는 효과의 차가 크지 않았던 점을 알 수 있었다.

附子湯은 실험실 연구에서 항산화 및 항염증 효과가 있었으며 MIA로 유발된 rat 모델의 골관절염에 대하여 연골보호 효과가 있고 indomethacin의 부작용인 위장관 장애도 완화할 수 있다고 생각되어 골관절염의 새로

운 치료제로 개발할 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다. 다만, 실험실 연구결과의 한계가 존재하고 추가적인 연구를 통해 검증이 필요할 것으로 판단된다.

## 결론»»»»

본 연구에서는 附子湯의 항산화, 항염증 및 관절염 동물 모델에 미치는 영향을 확인하기 위해 MIA로 유발한 rat에 분석 및 검사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뒷다리 체중부하 검사에서 통증이 감소되는 경향을 보였다.
2. 관절 조직에서 NOX4와 p22<sup>phox</sup>의 발현량은 유의하게 감소하였다.
3. 관절 조직에서 Nrf2와 HO-1, SOD의 발현량은 유의하게 증가하였다.
4. NF-κBp65, p-IκBα, iNOS, COX-2, IL-6, IL-1β, TNF-α의 발현은 유의하게 감소하였다.
5. 조직병리학적 검사에서 proteoglycan의 소실이 억제되었으며 연골 및 활막 조직의 손상이 효과적으로 억제되었다.

이상의 결과로 보아 附子湯은 항산화 및 항염증 효과가 있고 MIA로 유발한 rat 모델의 골관절염에 대해 염증 억제 및 연골보호 효과가 있음이 규명되었다. 향후 이를 기반으로 임상연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## References»»»»

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:102-16.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013:317-27.
3. Heo J. Donguibogam. Seoul:Donguibogam Publisher. 2005:1019-24.
4. Tong P, Xu S, Cao G, Jin W, Guo Y, Cheng Y, Jin H, Shan L, Xiao L. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis

model induced by mono-iodoacetate. J Ethnopharmacol. 2014;151(1):740-4.

5. Hong JW, Yang GE, Kim YB, Eom SH, Lew JH, Kang H. Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. BMC Complement Altern Med. 2012;12:237.
6. Lee JG, Yang CH. The study on chemical components and Korean medical effect of Poria cocos. The Journal of Jeahan Oriental Medical Academy. 2015;13(1):9-16.
7. Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide. Biol Pharm Bull. 2005;28(4):652-6.
8. Chung TY. Inhibitory effect of Korean ginseng extract on type II collagen-induced arthritis [dissertation]. Seoul: Yonsei University; 2009.
9. Kim HY, Han YM. Anti-inflammatory effect of paeoniflorigenone isolated from Paeoniae Radix. Yakhak Hoeji. 2012;56(1):20-5.
10. Bak JP, Son JH, Kim YM, Lee EY, Leem KH, Kim EH. Suppression of inflammatory macrophage response by Glycyrrhiza Uralensis herbal acupuncture extract. Korean Journal of Acupuncture. 2011;28(4):49-58.
11. Kim SH, Park YK. Effects of Atractylodis Rhizoma Alba extract on collagen-induced arthritis in mice. The Korea Journal of Herbology. 2012;27(3):1-6.
12. Kim JY, Kim SJ, Seo IB, Jeong SH. Effects of Buja-tang treatment on the early change of the monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. J Korean Med Rehabil. 2011;21(2):87-100.
13. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull. 1989;37(18):2016-21.
14. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7.
15. The Korean Society for Preventive Medicine. Prevention medicine and public health. 3rd ed. Seoul:Gyechuk Publishing. 2017:443.
16. Moon HP. First year of the 2013 National Health Statistics National Health and Nutrition Survey. Health Policy of the Ministry of Health and Welfare. 2014 [cited 2019 Dec 9]. Available from: URL: [https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04\\_03.do?classType=7](https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7).
17. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine.

- 19th ed. Seoul:MIP. 2017:3190-8.
18. Yun JH. Osteoarthritis update. *The Korean Journal of Medicine*. 2012;82(2):170-4.
  19. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Draquimir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM, Marcu KB. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 2011;21:202-20.
  20. Korean Herbalogy Society. *Herbalogy*. 3rd ed. Seoul: Young-lim. 2016:154-5, 345-7, 372-4, 573-6, 579-81, 584-6, 635-6.
  21. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett*. 2004;370(2-3): 236-40.
  22. Yang DH, Woo CH, Kim JM, An HD. Effects of Danggwisayeok-tang (Dangguisinitang) on MIA-induced osteoarthritis rats. *J Korean Med Rehabil*. 2015; 25(2):33-7.
  23. Cho YS, Choi JH, Zhang SY, Lee JH, Hwang KK, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS. Relationship of polymorphisms in the oxidative stress related genes - paraoxonase and p22<sup>phox</sup> - to Variant Angina and coronary artery stenosis in Korean. *Korean Circulation J*. 2003;33(2):104-12.
  24. Radermacher KA, Wingler K, Kleikers P, Altenhöfer S, Jr Hermans J, Kleinschnitz C, Hhw Schmidt H. The 1027th target candidate in stroke: Will NADPH oxidase hold up? *Exp Transl Stroke Med*. 2012;4(1):1-11.
  25. Jin BM, Lee MK, Lee JS, Hyun KY. Anti-inflammatory effects of Korean red ginseng extract in formalin-induced orofacial pain in rats. *J Korea Acad Industr Coop Soc*. 2014;15(9):5708-15.
  26. Lim JS, Ahn KY. Potassium depletion upregulates expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol*. 2011;30(3):239-45.
  27. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, Van Den Engel S, Mol WM, Weimar W, Baan CC. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3278-87.
  28. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010;5(1):51-66.
  29. Park SH, Lee HJ, Ryu JH, Lee SY, Shin HD, Hong JH, Seok JH, Lee CJ. Effects of silibinin and resveratrol on degradation of IκB and translocation of NF-κB p65 induced by tumor necrosis factor-α in cultured airway epithelial cells. *J Pharm*. 2014;58(1):1-6.
  30. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-64.
  31. Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, Zoer B, van Roermund PM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis. *Rheumatology*. 2006;45(4):405-13.
  32. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(2):15-20.
  33. Sakaguchi Y, Shirahase H, Ichikawa A, Kanda M, Nozaki Y, Uehara Y. Effects of selective iNOS inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. *Life Sci*. 2004;75(19):2257-67.
  34. Brüne B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl*. 2003;(84): S22-4.
  35. Lee SH, Kwon KD, Lee SW, Che SH, Ahn HS. Acetabular degeneration in osteonecrosis of the femoral head. *Journal of Korean Orthopaedic Association*. 2004;39(3):239-46.
  36. Song YJ, Ha CW. The use of COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of osteoarthritis. *J Korean Knee Soc*. 2009;21(2):84-92.
  37. Cho YJ, Moon SL, Park KH, Cho NC, Song YW. Comparison of side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rheumatoid arthritis patients. *J Kor Soc Hosp Pharm*. 1998;15(2):186-92.