

## 六味地黃湯加味方 약침이 연골세포에 미치는 영향

최원주 · 민상연 · 김장현

동국대학교-서울 대학원 한의학과

### Abstract

## Effect of Yukmijihwang-Tang Gamibang Aqua-acupuncture on the Recovery of Chondrocyte Phenotype

Choi Won Joo, Min Sang Yeon, Kim Jang Hyun

Dongguk Univ-Seoul, Graduate School of Oriental Medicine

### Objectives

The purpose of this study is to examine the effect of chondrocyte re-differentiation in using ukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture.

### Methods

In this study, chondrocytes were extracted from New Zealand white rabbit's knee joint, and cultured in monolayer after collagenase treatment. In the third passage, after the mRNA transcript of the type II collagen significantly reduced, diluted Yukmijihwang-Tang gamibang were added to cultured of chondrocyte, and its effect on the mRNA expression of type II collagen was quantitatively evaluated.

### Results

As a result of treatment with Yukmijihwang-Tang gamibang *in vitro* for 48 hours, the mRNA expression of type II collagen was up-regulated. In addition, the result of H&E-staining *in vivo* indicated that chondrocyte-like tissues were formed in repairing injured cartilages after 12 weeks of treatment with Yukmijihwang-Tang gamibang.

### Conclusions

These results indicated that Yukmijihwang-Tang gamibang was effective on the recovery of chondrocyte phenotype, and could be used for cartilage regeneration in arthritic diseases. However, more clinical study of Oriental medical treatment for this case might be also needed.

**Key words** : Chondrocyte, Yukmijihwang-Tang gamibang, Aqua-acupuncture, Type II collagen, Arthritis

## I. 緒論

퇴행성관절염의 주요 발병부위중 하나인 연골(cartilage)은 연골세포(chondrocyte)와 세포간 기질(extracellular matrix)로 구성되는데 연골 및 연골 주위의 관절 조직이 손상됨으로써 극심한 통증과 부종을 동반하며 병증이 진행됨에 따라 심각한 운동장애가 유발된다. 현재 관절염을 치료하기 위한 방법으로는 관절 세척술, 변연 절제술, 인공관절 치환술 등이 있으며 근래에 와서는 골 천공술 등과 같은 관절연골 재생을 이용한 방법도 사용되고 있다<sup>1)</sup>. 하지만 연골세포의 phenotype이 매우 가변적이라는 특성과<sup>2)</sup> 관절연골 자체의 치유력이 제한된 이유로 이러한 수술 방법들은 성공적인 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

따라서 관절 연골의 치유력 향상을 위해 관절 연골을 이루는 연골세포의 유지, 증식 및 분화를 촉진시키려는 많은 실험들이 행해져 왔으며<sup>3-5)</sup>, 세포성장인자인 FGF-2, bFGF 등이 연골세포 재생에 효과가 있는 것으로 연구된 바 있으나<sup>6,7)</sup>, 아직 획기적으로 관절 연골의 치유력을 향상시킬 수 있는 효과적인 치료법은 없는 상태이다.

膝關節은 인간이 직립 보행을 하면서 발생하는 체중의 부하를 가장 많이 받는 곳으로 하지의 屈伸 기능을 담당하고 있으며 그로 인해 연골의 손상으로 인한 퇴행성관절염이 가장 많이 好發하는 부위중의 하나이다. 韓醫學에서는 슬관절을 『內經素問』骨空論<sup>8)</sup>에서 “膝解”, “解關”이라 칭하였고 슬관절을 굴신케하는 슬개골을 “解臏” 또는 “臏”이라 칭하였다. 膝關節 질환에서 가장 많이 발생하는 증상은 膝痛과 이에 수반된 屈伸不利증상으로 서양의학에서 슬관절염에 해당한다고 볼 수 있다. 슬관절염에 대해서 『千金要方』<sup>9)</sup>에 “膝痺”, 『針灸大成』<sup>10)</sup>에 “膝紅腫”이라는 명칭으로 기술되어 있으며, 肝主筋, 腎主骨<sup>8)</sup> 하므로 肝腎이 虛할 때 風寒濕邪가 침습하여 슬관절염이 발생한다고 하였다. 치료적 측면에서는 기존의 鍼灸療法 및 藥物療法에 더하여 藥針療法이 임상에서 많이 사용되고 있는데, 藥針療法은 한의학에서 특정 經穴에 자침하여 經絡의 기능을 조절함으로써 疾病을 치료하는 鍼灸·經穴學의 이론과 약물이 인체의 기관이나 병소에 접근해서 작용하는 기전을 연구하는 本草學의 이론을 결합시켜 鍼灸治療와 藥物治療의 장점을 결합한 신침 치료법<sup>11)</sup>으로 최근에는 관절염에 관한 각종 약침요법의 효능이 임상논문 및 실험논문<sup>12-5)</sup>을 통해 보고되고 있다.

六味地黃湯加味方 약침은 肝腎不足, 陰虛로 인한 여

러 증상에 대표적인 처방인 六味地黃湯에 牛膝, 車前子, 女貞實, 枸杞子 등을 가미하여 약침액으로 제제화한 처방으로 腎陰虛의 제반 증상 및 腎虛腰痛, 腰脚無力, 月經不調, 午後潮熱, 骨蒸熱, 下肢浮腫 등의 적응증을 가지며<sup>11)</sup> 이는 肝腎俱虛로 인한 슬관절염의 증상에도 적합한 처방으로 사료된다<sup>15)</sup>.

이에 저자는 관절염의 주요 원인중 하나인 연골의 치료와 재생에 있어 六味地黃湯加味方 약침액의 효능을 검증하기 위하여 家兔(New Zealand White rabbit)의 연골을 채취하고 배양하여 RT-PCR 분석을 실행하고 흰쥐 무릎연골 손상 모델을 이용하여 조직학적 검사를 실행한 결과 몇 가지 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. *In vitro*

#### 1) 동물

몸무게가 250g 내외인 家兔(New Zealand White rabbit) 수컷을 샘타코사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 연골채취 및 연골배양

家兔를 ether로 마취시킨 후 뒷다리 슬 관절 부위를 삭모 및 소독(70% ethanol)하였으며 모든 작업은 무균상태에서 진행하였다. 먼저 소독한 핀셋 및 가위를 이용하여 슬 관절을 노출시켜 근육을 깨끗이 제거하고 칼날을 이용하여 연골부위를 slicing 하였다. 다음 petri dish의 PBS용액으로 2-3회 세척 후 0.02% Type II collagenase으로 incubator에서 6시간 처리하였다. 처리된 연골을 1,300rpm, 5분동안 centrifuge하고 pellet층을 취하여 3ml 배양배지를 첨가한 현탁액을 만들었다. 연골세포의 counting은 trypan blue를 이용하여 염색하고  $0.5 \times 10^5/cm^2$ 의 세포밀도로 petri dish에 치상한 후, 시행하였다. 세포배양은 95% air + 5% CO<sub>2</sub>의 humidified atmosphere 공기조건과 37°C 온도의 incubator 조건에서 수행되었으며, 배지로는 10% fetal bovine serum 과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM을 이용하였고 90% confluence에 도달하면 trypsin-EDTA를 처리하여 분주하였다.

#### 3) 약침액 제조 및 시술

六味地黃湯加味方 약침액은 대한약침학회로부터 제공 받았으며 수증기 증류냉각식 약침 추출법에 의해 제조되었다. 먼저 약재(牛膝, 車前子 50g, 熟地黃, 女貞實

30g, 山藥, 山茱萸, 枸杞子 20g, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉 10g) 를 채반을 이용하여 흐르는 증류수에 신속히 세척한 후 약재부피와 동일량의 증류수를 채우고 충분히 불린 후 반응전열기를 사용하여 증류냉각액을 추출하였다<sup>16)</sup>. 실험에서 배양한 세포를 세 번째 passage 까지 계대배양 한 후, 6시간 동안 incubator 내에서 세포를 안정화시키고 六味地黃湯加味方 약침을 100:1, 500:1, 1,000:1 및 5,000:1의 농도로 희석하여 각각 첨가하고 다시 48시간 동안 배양 한 후, RNA를 추출하여 분자생물학적 분석을 진행하였다.

**4) MTT 분석**

세포생존율에 대한 六味地黃湯加味方 약침의 영향을 알아보기 위하여 Raw 264.7 cell line을 96-well plate에 배양 후 六味地黃湯加味方 약침액을 원액, 0.1%, 0.01%, 0.001%로 희석하여 각각 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 처리하였다. 그 후 각 well에 1mg/ml 농도로 MTT 50 $\mu$ l를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 용액이 포함된 배양액을 제거하고 각 well당 0.04N HCL/isopropanol 150 $\mu$ l를 첨가하여 30분간 배양 후 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 실험은 최소 3회 이상 반복한 후, mean $\pm$ standard error (S.E.)로 표현하였다.

**5) RNA 추출 및 RT-PCR**

(1) Total RNA 추출

六味地黃湯加味方 약침을 연골세포에 처리하여 48시간 경과 후, 원심분리기를 이용하여 연골세포들을 모으고, PBS로 세척하였다. TRIzol<sup>TM</sup> 시약을 넣고 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 0.2ml의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 강하게 vortexing한 후 상온에 5분간 방치하였다. 그리고 12,000g에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 동일한 volume의 isopropanol을 첨가하여 수차례 inverting 한 후, -20 $^{\circ}$ C 조건에서 1시간 동안 보관하였다. 이어 12,000g에서 20분간 원심 분리하여 total RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 약 1ml의 75% ethanol을 첨가하고, 12,000g에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 침전물을 얻어 건조시켰다. 침전물의 양에 따라 적당량의 DEPC 함유 증류수에 녹이고 spectrophotometer를 이용하여 RNA농도를 측정 한 후, 다음 실험에 사용하였다.

(2) RT-PCR 분석

모든 RT reaction에서는 2 $\mu$ g RNA를 주형으로 하여

40U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies)를 이용하여 실시한다. RT mixture는 37 $^{\circ}$ C 온도조건에서 60분 간 반응한 후 97 $^{\circ}$ C에서 10분 간 가열하였다. PCR은 5U/ $\mu$ l Taq polymerase와 total cDNA의 1/20을 사용하여 실시하였다. PCR product는 1.0% agarose gel을 이용하여 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였으며 그 조건은 다음과 같다: 94 $^{\circ}$ C, 5min 1cycle: 94 $^{\circ}$ C, 30sec, 60 $^{\circ}$ C, 30sec, 72 $^{\circ}$ C, 30sec for 23 cycles, 72 $^{\circ}$ C, 10min, 4 $^{\circ}$ C. 실험에서 사용한 collagen type II primer는 다음과 같다: sense) 5'-gacccatgcagctacatgag-3'; antisense) 5'-agccgccattgatggtctcc-3'. 각 실험군의 sample은 최소 3마리 이상의 연골조직에서 추출된 total RNA를 합하여 사용하였다.

**2. In vivo**

1) 동물

六味地黃湯加味方 약침 효능검증실험에서는 체중 160g 내외의 암컷 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐를 선택하고 사로부터 동물실에서 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 무릎 연골 손상모델 및 조직학적 검증

(1) 무릎연골 손상유발

퇴행성관절염 모델의 제작은 전방십자인대절제<sup>17)</sup>, 근수축 유발물질 주입<sup>18)</sup>, 반월판 절제술<sup>19)</sup> 등과 같은 외과 수술을 통한 연골손상 모델을 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐는 helotane을 이용하여 마취 후, 뒷다리의 털을 제거하고 소독하였다. 수술방법은 조 등<sup>20)</sup>의 방법과 동일하게 진행하였다. 즉 무균조건 하에서 흰쥐 관절면을 칼과 핀셋을 이용하여 자체 제작한 칼날을 이용하여 슬개골의 patellar groove을 5 $\times$ 1mm 크기로 표기하여 연골을 subchondral bone까지 syringe로 충분히 파내 관절연골 손상을 만들었다.

(2) 약침액 및 치료

대한약침학회로부터 제공받은 六味地黃湯加味方 약침을 사용하였다. 약침치료는 연골 손상 수술 다음날부터 3일에 한번 씩 실험군에는 환측 무릎 강 내에 六味地黃湯加味方 약침을 주입하고 대조군에는 생리식염수를 주입하였다. 六味地黃湯加味方의 주입 농도는 1,000:1 희석액을 초기 농도로 정하고 7회 단위로 농도를 10배 씩 증가하여 21회부터 약침원액을 사용하여 12주까지 치료하였다.

(3) H&E-staining

① Slide 제작

치료 12주에 실험군과 대조군에서 sample을 선정 전 신마취 하에 슬개골 근위부를 관절면에서 약 1cm까지 적출한 후 조직 표본을 채취하였다. 조직검사 및 조직화학적 검사를 위해, 채취한 조직을 식염수와 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 녹인 4% paraformaldehyde(PFA)용액을 이용하여 관류 고정하였다. 이후 슬관절을 적출하여 4% PFA에 담가서 4°C에서 12-16시간 동안 후고정하여 PBS에 녹인 10% EDTA 용액에서 6주간 탈회하였다. 탈회된 슬관절은 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol로 탈수하여 xylene으로 투명화한 후 paraffin 용액으로 침윤시켜 paraffin으로 포매하였다. 포매된 조직은 4-6 $\mu$ m 두께로 section을 만들었다.

② 조직 염색

Hematoxylin-eosin (H&E) staining은 보편적인 염색 방법을 적용하였다. 각 절편은 탈paraffin 시킨 후, 100%, 90%, 80%, 70% 단계별 ethanol로 흡수시키고 Harris hematoxylin 용액에 7분간 염색한 뒤 1% HCl alcohol 용액과 ammonia로 침적시킨 다음, eosin 용액으로 30초간 염색하였다. 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol을 이용하여 순차적으로 탈수시킨 후 xylene으로 투명화한 뒤 봉입하여 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

III. 結果

1. *In vitro*

1) MTT 분석결과

MTT 분석결과 六味地黃湯加味方 약침액 처리군의 경우 대조군에 비하여 6시간 처리 시에 80% 미달한

생존율을 보였으나 처리 시간이 지남에 12시간 및 24시간의 경우에는 오히려 세포증식(cell proliferation)이 촉진되는 양상을 보였으며 이후 48 및 72시간의 장시간 처리 시에는 대조군과 비슷한 세포생존율을 나타내었다(Fig. 1). 이 결과로부터 약침액 원액 및 0.1부터 0.01, 0.001의 희석 조건에서는 세포에 독성이 없다는 것으로 확인하였으며 따라서 상기의 희석비율의 조건에서 *in vitro* 실험을 수행하였다.

2) 연골세포의 형태적 변화

정상적인 연골세포의 형태는 다사각형 혹은 타원형(Fig. 2-A)으로 나타나며 passage가 지나감에 따라 연골의 phenotype이 점차적으로 사라지고 형태도 사각형이 손실되면서 막대기모양으로 변화하게 된다(Fig. 2-C). 그러나 passage 3 단계에서 평판 배양 중인 연골세포에 六味地黃湯加味方 약침액을 처리하고 48시간이 경과했을 때 Fig. 2-D에서 보는 바와 같이 연골세포가 다시 타원형으로 복원되는 것으로 관찰되었으며, 세포밀도도 대조군에 비해 많이 증가된 것으로 관찰되었다. 또한 Glucosamine처리를 한 경우보다 연골세포의 복원력이 더 좋은 것으로 나타났다(Fig. 1-b).

3) RT-PCR 분석

정상적인 연골세포에서 계대 배양이 반복됨에 따라 특정유전자인 type II collagen의 발현양이 점차 감소되었으며, 특히 passage 3에서는 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

家兪 연골세포를 Passage 3에서 六味地黃湯加味方 약침액 농도(100:1, 500:1, 1,000:1, and 5,000:1)별로 48시간 동안 처리한 후 연골 특정유전자인 type II collagen의 발현양상을 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 500:1, 1,000:1 및 5,000:1로 희석된 六味地黃湯加味方 약침액

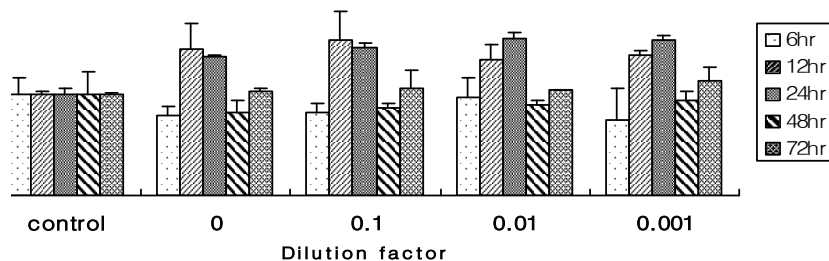


Fig. 1. Induction of concentration-dependent cell death in raw 264.7 cell line by Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture.

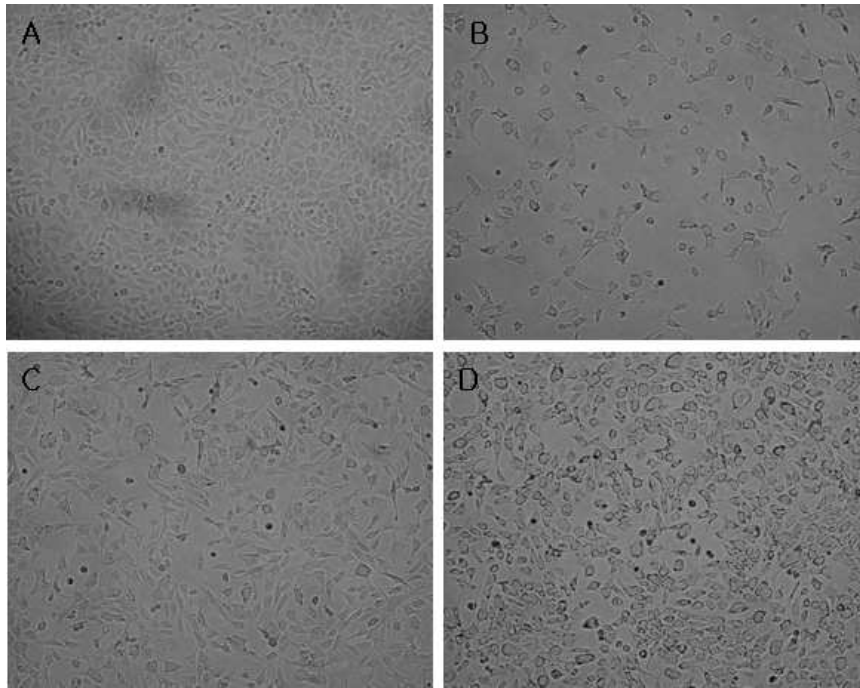


Fig. 2. Morphological characteristics of rabbit chondrocyte on third passage with no treatment (A) and with Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture treatment for 48hr (D). B: Glucosamine 400mg/l, used as a positive control.

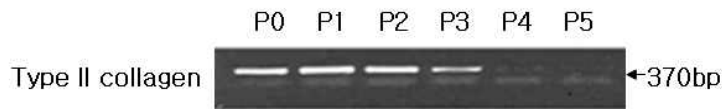


Fig. 3. RT-PCR analysis of type II collagen mRNA expression in rabbit chondrocyte from passage 0 to passage 5.

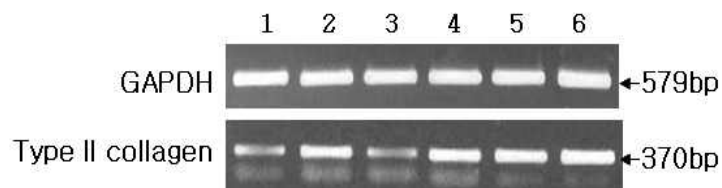


Fig. 4. RT-PCR analysis of rabbit chondrocyte, treated with different concentration of Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture on the third passage. Lane 1: control; Lane 2: glucosamine 400mg/l; Lane 3, 4, 5, and 6: diluted solution of Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture, 100:1, 500:1, 1,000:1, 5,000:1, respectively. Glucosamine was used as a positive control.

으로 처리 시, type II collagen 의 발현양이 대조군보다 유의하게 증가하였다. 대조군에서는 家兔 연골세포가 passage가 지나감에 따라 그 phenotype가 상실된다는 가정 하에 mRNA 발현양을 분석한 결과 type II collagen 유전자의 발현이 실제로 감소됨을 관찰하였으며 六味地黄湯加味方 처리군 에서는 연골의 type II collagen 유전자

의 발현양이 회복되었음을 확인할 수 있었다.

## 2. *In vivo* (H&E-staining 결과)

수술 4주 후 대조군의 조직 표본에서 연골 결손부가 주위 연골에 비하여 함몰된 것으로 관찰되었으며 연골 조직과 다른 섬유화 조직이 형성된 것으로 관찰되었다.

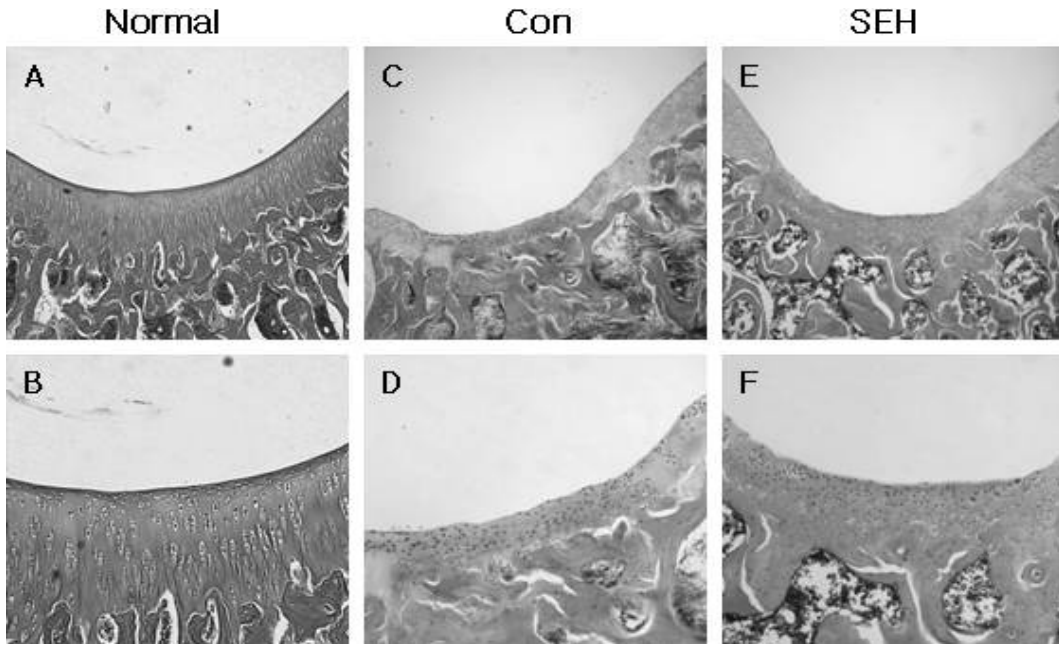


Fig. 5. Morphological characteristics (H&E staining) of cartilage tissues after treated with Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture at 12weeks. The magnification for A, C, E is 100, and for B, D, F is 200. The dotted lines indicated the defected regions in rat cartilage. A,B are normal, C,D are controlled, E, F are Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture treatmented. Normal: Cartilage tissues before treated with any aqua-acupuncture. Control: Cartilage tissues after treated with normal saline aqua-acupuncture. SEH: Cartilage tissues after treated with Yukmijihwang-Tang gamibang aqua-acupuncture.

반면 六味地黃湯加味方 약침액 처리군에서는 연골 결손 부위가 주위 정상연골과 비슷한 높이로 새로운 조직이 형성된 것으로 관찰되었다. 수술 8주 후부터 六味地黃湯加味方 약침액 처리군에서 관절면이 불규칙하게 형성되고 연골세포의 재생에 의한 cluster(연골유사조직) 형성이 관찰되었으나 대조군에서는 섬유화 조직이 많이 차지하고 있었다. Fig. 5는 수술 12주 후의 손상된 부분의 연골조직을 보여주는 H&E 조직염색 그림으로 점선부분의 안쪽이 연골표면부터 subchondral bone까지 syringe를 이용하여 격쇠형태로 만든 관절연골손상 부분이다. 12주 후 대조군과 六味地黃湯加味方 약침액 처리군 양쪽 모두에서 손상된 연골부분이 섬유조직 또는 연골유사조직으로 채워졌으며 형태상 새로 형성된 연골유사조직의 두께는 대조군이 六味地黃湯加味方 약침액 처리군(SEH) 보다 얇게 나타났다. 한편 六味地黃湯加味方 약침액 처리군의 경우에는 새로 형성된 연골유사조직내의 연골세포의 밀도도 정상 연골조직과 매우 비슷한 수준인 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

#### IV. 考 察

關節은 두 개 이상의 뼈가 만나는 곳으로 纖維關節, 軟骨關節, 潤滑關節 등이 있다. 뼈와 뼈 사이에는 뼈가 움직일 때 발생하게 되는 마찰을 최소화시키기 위해 매끄러운 연골로 덮여 있다. 연골 내에는 영양분을 공급해주는 관절액(활액)이 꼭 차있고, 뼈와 뼈를 연결해 안정성을 높여주는 인대들로 구성되어 있으며 완충작용을 위한 연골판과 관절을 보호하고 감싸는 관절막으로 둘러싸여져 있다<sup>21)</sup>. 연골은 특수하게 변형된 결합조직으로 관절을 보호하는 중요한 역할을 하며 기본적으로 적은 수의 연골세포 및 많은 양의 세포사이 물질로 이루어져 있다.

연골은 뼈의 경우처럼 표면이 섬유성 막인 연골막으로 덮여 있으며 연골의 재생은 이 막에서 이루어진다. 그러나 뼈와는 달리 연골 속에는 혈관이나 신경이 분포되어 있지 않으므로 연골은 신진대사의 대사율이 낮고 재생도 느리며 조직이 한번 생기게 되면 수명이 오래가게 되는 특징을 가진다. 연골의 물리적 특성은 매끄러운 면서도 질기고 탄력성이 있기 때문에 몸에서는 힘을 많이 받는 곳, 저항력과 탄력성이 필요한 곳, 바깥의 힘을

흘러지게 할 수 있는 곳 등에 위치한다. 특히 膝關節은 인간이 직립 보행을 하면서 발생하는 체중의 부하를 가장 많이 받는 곳으로 하지의 屈伸 기능을 담당하고 있으며 그로 인해 흔히 퇴행성 변화 또는 연골의 손상 등으로 痛症, 腫脹 및 屈伸不利 등의 증상 및 퇴행성관절염이 가장 많이 발생하는 부위중의 하나이다.

슬관절염의 발병원인에 대해서는 정확히 규명되어 있지 않으나 노쇠현상이나 과도한 체중과 관계가 깊으며<sup>22)</sup>, 연골세포의 기능적 변화, 기계적 손상 및 cytokine 인자 등 여러 가지 요인이 서로 복합적으로 작용하여 발병하는 것으로 이해되고 있다<sup>23)</sup>. 관절연골 재생을 위한 많은 의학적 노력<sup>24)</sup>이 있었지만 관절연골 자체의 치유 잠재력이 제한되어 있다는 단점으로 인해 이러한 치료 방법들은 성공적인 결과를 얻지 못하였다<sup>25)</sup>. 또한 관절연골을 이루는 연골세포를 단층배양 할 경우 passage넘김에 따라 연골세포의 표현형이 소실되는 역분화 과정으로 연구에 많은 어려움을 초래해왔다. 이러한 역분화(de-differentiation)된 연골세포의 표현형을 되돌리기 위해서는 지금까지의 연구결과 생체와 비슷한 환경인 3차원 배양, agarose gel 배양 등 방법을 실시할 경우 연골세포의 표현형이 되돌아오미 보고되어 있으며<sup>26)</sup>, 한약제중에서 봉독, 녹용약침 및 홍삼사포닌 등이 연골세포에 대한 치료효능 등을 보도한 바 있다<sup>1,19,25)</sup>.

예로부터 韓醫學에서는 膝關節에 대해 『內經素問』 骨空論<sup>8)</sup>에서 “膝解”, “骸關”이라 칭하였고 膝關節을 골신케 하는 膝蓋骨을 “解膾” 또는 “膾”이라 칭하였다. 또한 무릎 관절염에 대해 『內經靈樞』 雜病篇<sup>27)</sup>에서는 “膝中痛”이라하였고, 『內經靈樞』 經脈篇<sup>27)</sup>에는 “解膾腫痛”이라 기술되어있으며, 孫<sup>9)</sup>은 “膝痺”, 楊<sup>10)</sup>은 “膝紅腫”이라 記述하였으며, 『內經素問』 痺論<sup>8)</sup>에서는 “風寒濕三氣雜至 合而成痺”라 하였고 『鑑別診斷學』등에는 “痺症”, “痛風”등의 범위에 속한다고 하였다<sup>28)</sup>. 또한 許<sup>29)</sup>는 “膝爲筋府”, 『內經素問』 五臟生成論<sup>8)</sup>에서는 “諸筋者, 皆屬於節”이라 하여 슬관절염이 특별히 肝腎과 밀접한 관계가 있음을 예시하고 있다. 따라서 이를 종합해보면 肝腎이 허약해 진 틈을 타서 風寒濕三氣가 인체에 침입해서 經絡을 壅塞하고 氣血이 凝滯되어 관절내에 疼痛을 일으키는 것으로 이해할 수 있으며<sup>8)</sup> 이에 대한 치료는 鍼灸치료, 藥鍼치료, 藥物치료 등의 방법이 사용되고 있다<sup>30)</sup>.

六味地黃湯은 주로 熟地黃, 山茱萸, 山藥, 澤瀉, 牡丹皮, 白茯苓 등으로 구성되어 있으며 方劑 중 熟地黃은 滋腎填精 하며 山茱萸는 肝腎을 養하며 澁精하고 山藥

은 脾陰을 補益하여 固精하는 효능이 있어 三藥이 合用하면 三陰을 補하는 효능을 달성하게 된다. 六味地黃湯의 효능은 補肝腎, 清虛熱, 利濕하여 肝腎虛損으로 오는 腰膝痠軟, 腰脚無力, 下肢浮腫 등의 적응증을 가지며<sup>31)</sup>, 골 형성 및 골다공증 등 골 관련 실험에 사용되고 있다. 六味地黃湯에 대한 연구에 신장기능<sup>32)</sup>, 항산화작용에 관한 보고는 있지만 연골재생효능에 대한연구는 아직 미미한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 六味地黃湯加味方이 연골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대한 약침학회에서 제공받은 六味地黃湯加味方 약침액을 이용하여 *In vivo* 실험과 *In vitro* 실험을 나누어 진행 하였다. *In vitro* 실험에서는 家兔를 이용하여 연골을 채취 및 배양하였고 MTT 검사를 통해 세포독성을 검증한 후 실험을 진행하였다. MTT 검사는 각각 원액, 0.1, 0.01, 0.001 농도의 六味地黃湯加味方 약침액으로 하였고 분석결과 초기 6시간 처리시에는 대조군에 비해 80%의 생존률을 보였으나 12~48 시간까지 처리했을 때는 모두 대조군보다 높거나 비슷한 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없다는 것을 확인하였다.

연골 세포의 가장 큰 특징 중의 하나는 분화된 특성을 소실하는 탈분화(de-differentiation)현상이 일어나고 다시 탈분화된 세포가 재분화(re-differentiation)하는 등 그 phenotype이 매우 가변적이라는 것인데, 생체 내에서의 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 생체 외에서 interleukin (IL)-1b, retinoic acid, epidermal growth factor, nitric oxide (NO) 등에 노출되거나 연골세포를 생체 외에서 저밀도 단층배양하면 passage 1에서부터 type II collagen의 발현이 줄어들기 시작하고, 대신 fibroblast의 특징인 type I 및 III collagen의 발현이 일어난다<sup>2)</sup>.

본 연구에서는 이러한 연골세포의 특성을 이용하여 연골세포를 단층 배양한 후 type II collagen의 발현이 현저히 떨어지는 passage 3에서 六味地黃湯加味方 약침을 평판 배양중인 연골 세포에 처리했을 때 48시간이 경과한 후 길쭉해졌던 연골세포가 다시 사각형 및 다각형으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 2), 이와 유사한 결과가 Stockes 또는 Laurence 의 논문에도 보고된 바가 있다<sup>33,34)</sup>. 다만 연골 세포의 형태가 사각형 및 다각형으로 변하는 것을 연골의 특성이 회복된 것으로 확정할 수는 없다. 따라서 이는 보조적인 실험결과로 참고해야 할 것으로 사료된다.

또한 六味地黃湯加味方 약침의 효과를 RT-PCR을 통해 분자생물학적 방법으로 검증하였는데 Fig. 3에 나타난

것처럼 연골세포의 특정유전자인 type II collagen의 mRNA발현은 계대배양에 따라 점점 감소되고, 특히 passage 3에서는 급격히 감소되는 것을 볼 수 있었다. 하지만 家兔 연골세포를 Passage 3에서 六味地黃湯加味方 약침을 농도(100:1, 500:1, 1,000:1, and 5,000:1)별로 48 시간 동안 처리한 후 연골 특정유전자인 type II collagen의 발현양상을 관찰한 결과 passage 3에서 type II collagen의 mRNA level에서의 발현이 다시 증가하는 결과를 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 이로써 연골세포의 phenotype는 계대배양을 함에 따라 급격히 상실되는 것이 일반적인 경과이나 passage 3에서 六味地黃湯加味方 약침액을 처리할 경우 그 phenotype의 상당부분이 다시 회복되는 것으로 판단된다. 또한 흰쥐를 이용한 *In vivo* 실험에서는 흰쥐의 무릎 연골을 손상시킨 후에 六味地黃湯加味方 약침액을 관절강 내에 주사하고 대조군은 생리 식염수를 주사하였다. 12주간의 실험 후에 흰쥐의 무릎 관절에서 조직 표본을 채취하여 H&E-staining을 을 통해 조직을 염색하고 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 5 와같이 무릎연골 손상 실험 12주 후 대조군과 六味地黃湯加味方 약침액 처리군 양쪽 모두에서 손상된 연골부분이 섬유조직 또는 연골유사조직으로 채워졌으나 형태상 새로 형성된 연골유사조직의 두께는 六味地黃湯加味方 약침액 처리군(SEH)이 대조군보다 두껍게 나타났다. 한편 六味地黃湯加味方 약침액 처리군의 경우에는 새로 형성된 연골유사조직내의 연골세포의 밀도도 정상 연골조직과 매우 비슷한 수준인 것으로 관찰되었고 이러한 결과는 다른 단일물질을 연골세포에 처리한 경우에도 유사한 결과를 얻을 수 있었다<sup>35)</sup>. 이상의 *In vivo* 실험과 *In vitro* 실험의 결과를 통해서 六味地黃湯加味方 약침이 연골세포의 phenotype 회복에 효과적인 것을 판단 할 수 있었으며 앞으로 六味地黃湯加味方의 효능 검증을 위해 더 깊은 연구와 분석이 필요한 것으로 사료 된다.

## V. 結 論

六味地黃湯加味方 약침이 연골 세포에 미치는 영향을 연구하고자 家兔의 연골을 채취하고 배양하여 RT-PCR 분석을 실행하고 흰쥐 무릎연골 손상 모델을 이용하여 조직학적 검사를 실행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 家兔의 연골세포 단층 배양 시 passage 3에서 六味地黃湯加味方 약침액을 48시간동안 처리한 결과 passage 3에서의 type II collagen의 발현이 mRNA 수준에서 대조군보다 증가한 것으로 관찰되었다.
2. 흰쥐 무릎연골 손상 모델에서 六味地黃湯加味方 약침을 12주 동안 처리 결과 손상조직 부분에서 cartilage와 비슷한 조직이 형성되었으며 형태 및 밀도도 정상 연골 조직과 매우 유사하게 나타났다.

## 參 考 文 獻

1. 성진형, 류재덕, 정형균, 김진영. 홍삼사포닌이 사람의 관절연골세포에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1998;33(7):1921-7.
2. Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo YJ, Huh TL, and Chun JS. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. The Journal of Biological chemistry. 2002;277(10): 8412-20.
3. Chen GP, Liu DC, Tadokoro M, Hirochika R, Ohgushi H, Tanaka J, and Tateishi T. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in a cobweb-like biodegradable scaffold. Biochemical and Biophysical Research Communication. 2004;322:50-5.
4. Benya PD, 5. Shaffer JD. De-differentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell. 1982;30:373-84.
5. Benaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Exp Cell Res. 1994;212:97-104.
6. Molly M. Stevens, Robert P. Marini, Ivan Martin, Robert Langer, and V. Prasad Shastri. FGF-2 enhances TGF-beta1-induced periosteal chondrogenesis. Journal of Orthopaedic Research. 2004;22:1114-1119.
7. Weisser J., B. Rahfoth, A. Timmermann, T. Aigner, R. Brauer, and K. von der Mark. Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose. Osteoarthritis and Cartilage 9, Supplement A, 2001;48-54.



8. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 서울: 一中社, 1991:95, 210, 328, 445.
9. 孫思邈. 千金要方. 서울: 대성출판사. 1984:534.
10. 楊繼週. 鍼灸大成. 서울: 대성문화사. 1985:418, 419
11. 이혜정. 약침학 개론 및 임상. 서울: 一中社. 1999: 13-14, 92-4.
12. 이한창, 염미정, 김건호, 심인섭, 최강덕, 이혜정, 함대현. 흰쥐의 adjuvant 유발 다발성 관절염에 대한 미황약침의 치료효과, 동의생리병리학회지. 2003;17(2): 346-51.
13. 도원석, 장준혁, 김경호, 윤종화, 김갑성. 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1995;12(1):211-20.
14. 황규선, 정형섭, 백종엽, 이상무, 한희철, 안호진, 정동화. 표고버섯 약침의 퇴행성 슬관절염 치료효과에 관한 임상연구. 대한침구학회지. 2001;18(6):141-50.
15. 김건호, 함대현, 이한창, 염미정, 한동오, 조미애, 심인섭, 김장현, 이혜정. 흰쥐의 adjuvant-induced knee arthritis에 대한 신음허 약침의 치료효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(4):1001-6.
16. 대한약침학회. 약침요법시술지침서. 서울: 대한약침학회. 2000:157-159, 12, 18-33.
17. 李泓錫, 金容爽, 朴英培, 高炯均, 金昌煥, 姜成吉. 봉독약침자극이 Methothrxate로 유발된 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1998; 21(1):347-59.
18. Barbara Rudolf. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. Academic Press. 1986:329-402.
19. Spoerri, PE. Apamin from bee venom. Neurobiology. 1973;3:207-214.
20. 조미애, 함대현, 이승기, 최선미, 김건호, 심인섭, 강성길, 이혜정. 흰쥐 퇴행성 관절염모델을 이용한 봉독약침의 치료효과. 동의생리병리학회지. 2005; 19(3):618-622.
21. 정인혁. 사람해부학. 서울: 아카데미서적. 1992:10-13.
22. 고경석, 강성길. 퇴행성 슬관절 질환의 임상적 고찰. 대한한의학회지. 1987;8(2):70-1.
23. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상의 관찰. 대한침구학회지. 2001;18(3):35-47.
24. Friedman MJ, Versi CC, Fox JM, Del-Pizzo W, Synder SJ, and ferkel RD. Preliminary results with abrasion arthroplasty in osteoarthritic knee. Clin Orthop. 1984; 182:200-5.
25. Kim M.J., Lee S. D., Kim G. H., Kim G. S. Effects of deer antler Water Extract (pilose antler of Cervus Korean TEMMINCK var. mantchuricus Sinhoe) on chondrocytes. 대한침구학회. 2004;21(2):73-88.
26. 김범수, 장준섭. 토끼의 성장판 연골세포에서 배양방법에 따른 TGF-β1의 역할 변화. 대한정형외과학회지. 1999;34(5):849-57.
27. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯解. 서울: 一中社. 1991:113, 245.
28. 이영재, 김경식. 퇴행성 슬관절염에 대한 침치료 및 연구의 임상고찰. 대한침구학회지. 1994;11(1):465-72.
29. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 남산당. 1975:295, 300.
30. 이성노, 홍서영, 조현철, 변임정, 송호섭, 김기현. 蜂藥鍼治療의 退行性膝關節炎에 대한 臨床의 考察. 대한침구학회지. 2003;20(5):73-81.
31. 이상인, 김동걸, 김영중, 노승현, 주영승, 김영관. 方劑學. 서울: 영림사. 1994:178-9.
32. 이문호, 손인철. 육미지황탕 및 팔미지황탕의 약침이 신장기능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998; 15(2):255-77.
33. David G. Stokes, G. Liu, Rita Dharmavaram, David Hawkins, Sonsoles Piera-velazquez, and Sergio A. Jimenez. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box(SOX) transcription factors. Biochem. J. 2001;360:461-70.
34. Laurence Borge, Sylvie Demignot, and Monique Adolphe. Type II transglutaminase expression in rabbit articular chondrocytes in culture: relation with cell differentiation, cell growth, cell adhesion and cell apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta. 1996;1312: 117-24.
35. Chuma H., H. Mizuta, S. Kudo, K. Takagi, and Y. Hirak. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. OsteoArthritis and Cartilage. 2004;12:834-42.