

## 퇴행성 골관절염에 대한 HPL-04의 효과

나지영<sup>1</sup> · 송기쁨<sup>1</sup> · 김석호<sup>1</sup> · 권영배<sup>2</sup> · 김대기<sup>3</sup> · 이준경<sup>4</sup> · 조형권<sup>4</sup> · 권중기<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 수의과대학 실험동물의학교실, <sup>2</sup>전북대학교 의학전문대학원 약리학교실  
<sup>3</sup>전북대학교 의학전문대학원 면역학교실, <sup>4</sup>한풍제약

### Effects of HPL-04 on Degenerative Osteoarthritis

Ji-Young Na<sup>1</sup>, Ki-Bbeum Song<sup>1</sup>, Sukho Kim<sup>1</sup>, Young-Bae Kwon<sup>2</sup>, Dae-Gi Kim<sup>3</sup>,  
Jun-Kyoung Lee<sup>4</sup>, Hyoung-Kwon Jo<sup>4</sup>, and Jungkee Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Dept. of Pharmacology,  
Institute for Medical Science, and <sup>3</sup>Dept. of Immunology, Institute for Medical Science,  
Chonbuk National University, Jeonbuk 561-756, Korea

<sup>4</sup>Central Research and Development, Hanpoong Pharm & Foods, Jeonbuk 561-841, Korea

**ABSTRACT** HanPoong Leading (HPL)-04 were prepared with different oriental medicines (balk of *Kalopanax pictus* balk, *Chaenomelis Fructus*, *Angelica gigas* root, *Zingiber officinale*, *Raphanus sativus* Linne and *Saururus chinensis* Baill.) to investigate the protective effects of HPL-04 on cartilage degradation in knee osteoarthritis (OA). Rat articular chondrocytes incubated with rhIL-1 $\alpha$  markedly increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and 9 activities, decreased cell viability and reduced chondrogenic gene expression. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, MMP-2 and 9 activities and real time RT-PCR indicated that HPL-04 counteracted these harmful effects in dose-dependent manner. In addition, for experimental OA *in vivo*, monosodium iodoacetate (MIA, 0.5 mg/50  $\mu$ L) was injected into knee joints of rats and administered HPL-04 to rats for 4 consecutive weeks after MIA treatment. The experimental data showed that treatment with HPL-04 significantly prevented of MMP-2 and 9 activities in articular cartilage. Histopathological and micro-CT evaluations of the knee joints also revealed that HPL-04 effectively ameliorated MIA-induced degenerative OA. In conclusion, HPL-04 has potential applicability for the prevention and treatment of degenerative OA.

**Key words:** HPL-04, osteoarthritis, monosodium iodoacetate, chondrocytes, matrix metalloproteinase

## 서 론

최근 들어 한의학에서도 EBM(근거중심의학: evidence based medicine)에 입각한 연구 및 교육 그리고 의사의 수행평가 필요성이 제기되고 있다. 근거중심의학(EBM)은 권위가 아닌 근거에 입각하여 치료하고, 그 치료를 DB화하여 체계적으로 관리하면서 의사의 수행 평가와 대학 교육에도 반영하는 것을 말한다(1-3). “한의학의 과학화 및 표준화”와 “한의학의 EBM 도입”은 교육 및 임상수행 평가뿐만 아니라 연구개발 방법론에서도 새로운 방향을 제시하고 있으며 이러한 노력과 시도를 통해 천연물 신약 개발에 새로운 가능성을 제시하고자 한다. HPL-04(HanPoong Leading-04) 처방은 이러한 EBM에 입각하여 철저한 고문헌 사료조사와 기초실험 문헌, 임상자료 및 임상활용 현황 등의 자료들을 수집하고 조사, 분석하여 선정된 골관절염의 개선 및

치료 또는 관절건강에 도움을 주는 천연물 유래 기능성 복합 처방이다.

골관절염은 퇴행성관절염(degenerative arthritis)으로도 불리는 흔한 관절질환이지만 통상적으로 노화에 따른 퇴행현상으로 보는 시각이 있기 때문에 치료나 질병관리에서 간과되어온 면이 있다(4). 하지만 골관절염은 고령화 사회와 비만인구의 증가로 인해 유병률이 지속적으로 증가하고 있으며 국민건강영양조사를 기초로 한 보고에 따르면 2008년 기준 한국 성인 중 10.7%가 골관절염을 앓고 있으며 연령에 따라 비율이 증가하여 80대에서는 34.5%에 이르는 것으로 추정된다(5). 주로 연골하부와 골소주 및 관절연골의 병리적 대사로 발생하며 경증의 활막 염증, 관절연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등과 함께 통증이 동반되는 질환이다(6,7). 골관절염의 원인과 병태생리는 다양하며 현재까지도 정확하게 알려져 있지 않지만 성인 특히 중장년층에게 흔하게 나타나는 대표적인 노인성 질환으로써 연령과 비만도가 증가할수록 증가되며, 발병과 악화에 있어 특정관절의 과도한

Received 23 September 2013; Accepted 13 November 2013

\*Corresponding author.

E-mail: jkwon@jbnu.ac.kr, Phone: +82-63-270-3884

사용과 반복적인 자세 및 외상 등 생활요인과의 관련성이 높다고 알려져 있다(8,9). 골관절염의 치료는 비약물적 치료, 약물치료, 수술적 치료 세 가지가 있으며 약물치료로서 흔히 쓰이는 아세트아미노펜 및 비스테로이드성 항염제(NSAID; non-steroidal anti-inflammatory drug)는 소화기계 및 혈액응고기전의 부작용으로 장기 복용 시 속쓰림, 위출혈 등을 유발할 수 있으며, 질병 완화 골관절염 치료제(disease modifying osteoarthritis drugs)의 경우 질환의 초기에 사용되어 관절의 파괴를 예방하는데 일부 유효성에 대한 논란이 있으며 골수억제, 간 기능 손상과 더불어 발암의 가능성이 있다(10). 이처럼 현재까지 골관절염의 적절한 치료법은 미흡한 수준이며, 특히 기존 약물들에 대한 부작용으로 인하여 한약제 및 생약 등의 천연물 신약 치료제를 개발하려는 노력이 최근 활발하게 진행되고 있다(11-13). 한의학적 관점에서 관절염은 크게는 비증(痺證), 작게는 관절풍(關節風)에 해당하는 질병으로 볼 수 있다(14). 비증(痺證)이나 관절풍(關節風)은 인체의 정기가 허한 상태에서 기육(肌肉)과 경락(經絡)에 풍한습(風寒濕)의 사기(邪氣)가 침습하여 발생하는 질환이며, 실증인 경우와 허증인 경우에 따라 증상에 차이를 나타내지만 동통, 종창, 발적, 발열 및 운동장애 등의 관절염과 비슷한 양상을 나타낸다.

HPL-04 처방은 한의학적으로는 거풍습(祛風濕) 효능으로 허리 및 무릎 등의 관절통을 치료하는 해동피와 멩친 근육을 이완시키고 붓기를 가라앉히는 모과, 보혈(補血) 및 온경지통(溫經止痛)의 효능으로 혈액순환을 돕고 통증을 멎게 하는 당귀, 해독소종(解毒消腫)의 효능으로 염증을 억제하는 삼백초(三白草) 등(15) 6가지 약재로 구성되어진 골관절염 개선 및 치료 또는 관절건강에 도움을 주는 천연물 유래 기능성 복합처방이며, 본 실험에서는 골관절염 동물 모델을 이용하여 HPL-04의 유효성 및 과학적 근거를 확립하기 위하여 다음과 같이 실시하였다.

## 재료 및 방법

### HPL-04 제조

본 실험에 사용한 HPL-04 처방의 구성 약물은 옴니허브 및 원광허브(Iksan, Korea)에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 각각 원료들의 원료 시험성적서를 통해 기원을 확인하였으며 잔류농약, 잔류이산화황, 중금속 시험 등의 유해물질 검사에서 모두 적격품임을 확인한 후 HPL-04 제조에 사용하였다. 각각의 6가지 생약을 해동피, 모과, 당귀, 내복자, 삼백초, 생강 각각의 생약원료에 10배수의 정제수를 넣고 95~100°C, 3시간 환류추출 2회 실시 후 추출액을 25 µm 필터로 여과한 후 여과액을 60°C 이하에서 감압 농축·건조하여 각각의 건조엑기스를 얻었고, 각각의 해동피 : 모과 : 당귀 : 생강 : 내복자 : 삼백초를 Table 1과 같은 비율로 혼합하여 건조엑기스를 제조하였다.

**Table 1.** The composition of HPL-04

Herbal medicine name	Ratio
<i>Kalopanax pictus</i> bark	3
<i>Chaenomelis</i> Fructus	3
<i>Angelica gigas</i> root	3
<i>Saururus chinensis</i>	2
<i>Raphanus sativus</i>	2
<i>Zingiber officinale</i>	2

### 슬관절에서 연골세포의 분리

연골 채취를 위한 실험동물은 3~4주령 무게 약 180~200 g 정도의 male Sprague-Dawley rat(Damul science, Daejeon, Korea)을 경주 탈구하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 관절연골을 2~3 mm 정도 크기로 채취하였고 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(PBS) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮겼다. 2 mg/mL collagenase type II(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 shaker에 1,200 rpm으로 3시간 동안 처리하였다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 70 µm pore size cell strainer(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리된 세포를 PBS로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포는 10% FBS와 DMEM에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 75T flask에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 배양하였다. 이때 2~3일에 한 번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대하여 사용하였다.

### 약물 독성 및 세포 생존율 측정

세포 독성 및 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 2×10<sup>4</sup> cells/well의 세포를 96 well plate에 넣어준 뒤 24시간 안정화시켜 준다. 안정화된 세포는 농도별로 HPL-04(1~200 µg/mL)를 24시간 동안 단독 처리한 군과 HPL-04(1~200 µg/mL)를 1시간 전처리한 뒤 rhIL-1α(5 ng/mL)를 넣고 24시간 동안 배양한다. 24시간 뒤에 20 µL MTT solution을 처리하여 최대 3시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고 DMSO 시약 200 µL를 가하여 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 연골 흡수 지표(matrix metalloproteinase(MMP)-2, 9) 활성 측정

MMP-2, 9의 발현 확인을 위해 실험동물에서 분리한 연골세포를 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 HPL-03, HPL-04를 농도별로 처리하고 rhIL-1α(5 ng/mL)를 처리하여 24시간 배양한 후에 상층액을 이용해 MMP-2, 9를 측정하였다 MMP-2, 9 측정을 위해 MMP ELISA kit(Mybiosource, San Diego, CA, USA)를 이용하

**Table 2.** Primer sequences for real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Gene name	Sequences
Collagen type II	Forward: GAGTGGAAAGAGCGGAGACTACTG Reverse: CTCCATGTTGCAGAAGACTTTCA
SOX9	Forward: AGAGCGTTGCTCGGAAGTGT Reverse: TCCTGGACCGAAACTGGTAAA
Aggrecan	Forward: GATGTCCCCTGCAATTACCA Reverse: TCTGTGCAAGTGATTCGAGG
$\beta$ -Actin	Forward: ATCGTGGGCCGCCCTAGGCA Reverse: TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG

였고 general ELISA protocol을 따라서 실험한 뒤 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 연골 형성 지표(collagen type II, SOX9, aggrecan) 활성 측정

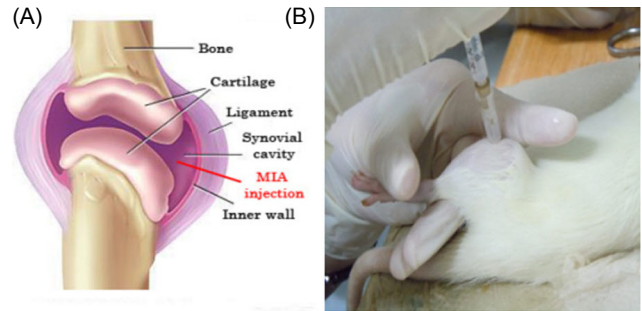
실험동물에서 분리한 연골세포를 6 well plate에  $5 \times 10^6$  cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후 HPL-04를 농도별로 1시간 전처리 해준 뒤 rhIL-1 $\alpha$ (5 ng/mL)를 연골세포에 24시간 동안 처리한 후 세포를 수집하여 Ribo EX(GeneAll, Daejeon, Korea)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA synthesis kit(Maxime™ RT PreMix; Intron, Seongnam, Korea)를 이용하였다. 각 primer의 염기서열은(Table 2) primer express software(Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 디자인 되었다. Real-time PCR 실험 시 사용할 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)이며 SYBR Green Supermix(BIO-RAD, Hazelwood, MO, USA)로 제품의 protocol에 따라 반응하였다. PCR은 48 well plate에서 ABI Step One Plus Sequence Detection System(Applied Biosystems)을 사용하였다.

### 동물

실험에 사용된 rat는 SD-rat 8주령(250~280 g)이고 모두 수컷을 사용하였다. 좌측 슬관절에 연골 연화성 관절염을 유도하였으며 우측 슬관절은 비교군으로 사용하였다. 모든 대상 실험쥐는 사료와 음수를 사육기간에 마음대로 섭취하도록 하였으며 사육장 내에서 제한 없이 운동하도록 하였다. 퇴행성 골관절염 모델은 monosodium iodoacetate(MIA) 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ L를 슬관절 관절낭에 직접 투여하여 유발시켰다.

### 약물투여 및 관절염 유발

실험동물은 군당 5마리씩 4그룹으로 구분하였고 모든 투여군에서는 HPL-04를 멸균중류수에 용해시켜 존데가 부착된 1 mL 주사기를 이용하여 경구투여 하였다. 실험동물실에



**Fig. 1.** A schematic diagram of degenerative osteoarthritis induced by intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA).

서 적용된 rat은 조레틸(zoletil)로 전신마취 후 수술대에 고정시키고 MIA를 왼쪽 슬관절의 슬개골 인대를 통해 관절낭 내 주사(intraarticular injection)를 실시하였다. MIA는 sterile saline에 마리당 0.5 mg/50  $\mu$ L의 농도로 26 gauge를 이용하여 주사하였다. 정상군은 동일한 위치에 sterile saline 50  $\mu$ L씩 주사하였다(Fig. 1).

### 연골흡수 지표(MMP-2, 9) 활성 측정

연골 염증성 인자 중 MMP-2, 9의 발현 확인을 위해 rat에서 분리한 연골을 phosphate buffer saline로 세척한 후 분쇄기로 잘게 분쇄해 준다. 분쇄된 연골은 RIPA buffer를 처리해준 뒤에 15,000 rpm에서 원심분리 후 상층액을 이용해 MMP-2, 9를 측정하였다. MMP-2, 9 측정을 위해 MMP ELISA kit(Mybiosource)를 이용하여 general ELISA protocol을 따라서 실험한 뒤 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 슬관절 micro CT를 이용한 평가

모든 실험쥐들은 MIA 주입 및 HPL-04의 경구투여 4주 후에 조레틸(zoletil)로 마취시킨 뒤 양쪽 슬관절에 대해 각각 관절면을 중심으로 micro-CT(SkyScan, Aartselaar, Belgium) 촬영을 시행하였다.

### 조직학적 관찰 및 평가

관절염 유발 4주째 치료 종료 후 모든 rat을 부검하여 슬관절을 군별로 채취하였다. 채취한 슬관절은 10% 포르말린으로 24시간 고정하였고 그 후 파라핀 포매 전 10% formic acid로 72시간 동안 탈회하였다. 탈회 후 파라핀 블록을 제작하였고 5  $\mu$ m로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 슬관절 절편은 관절 조직 및 주변 조직의 염증성 침윤(inflammation) 정도를 평가하기 위해 슬라이드에 부착시켜 hematoxylin&eosin(H&E) 염색을 실시하였고 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green(SOFG) 염색을 실시하였다. 또한 퇴행성 골관절염 부위의 보호 정도를 평가하기 위하여 조직병리학적 평가를 3개의 등급에 의해

표현하였다. 등급은 Medplan Pathology Laboratories (Seoul, Korea)에 의해 실시하였다(16).

**통계학적 분석**

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 그리고 각 실험군 간의 차이를 검정하기 위하여 Student's *t*-test를 실시하였다. 실험의 분석 시 유의수준은 *P*<0.05로 설정하여 검정하였다.

**결 과**

**세포 독성 및 생존율 평가**

Primary culture된 연골세포에 대한 HPL-04의 세포 독성 및 생존율을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. rhIL-1α를 단독 처리한 군에서는 생존율이 유의성 있게 증가하였고, HPL-04(100 µg/mL)를 1시간 전처리 후 rhIL-1α(5 ng/mL)를 24시간 처리한 군에서는 생존율이 유의성 있게 감소하는 것이 보였다(Fig. 2A, B). 본 실험의 결과 HPL-04가 rhIL-1α에 의해 감소되는 세포 생존율을 증가시키는 것으로 사료된다.

**In vitro에서 염증성 인자인 MMP-2, 9의 활성화도 평가**

rhIL-1α는 연골 염증성 인자인 MMP-2, 9를 유발시킨

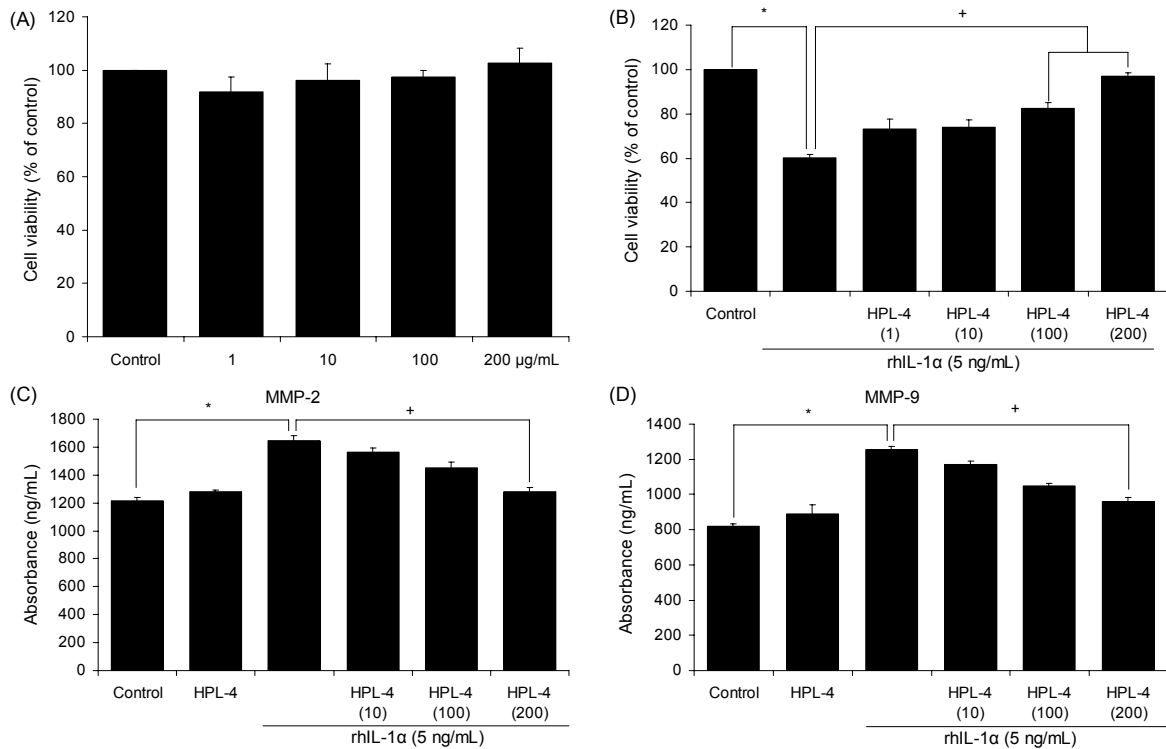
다. rhIL-1α를 단독 처리한 군에서는 MMP-2, 9이 증가하였고, HPL-04(100 µg/mL)를 1시간 전처리 후 rhIL-1α(5 ng/mL)를 24시간 처리한 군에서는 MMP-2, 9가 감소하는 것이 보인다(Fig. 2C, D). 본 실험의 결과 HPL-04가 rhIL-1α에 의해 유발된 염증성 인자인 MMP-2, 9의 활성도를 감소시키는 것으로 사료된다.

**HPL-04에 대한 연골 형성지표(collagen type II, SOX9, aggrecan) 활성화 평가**

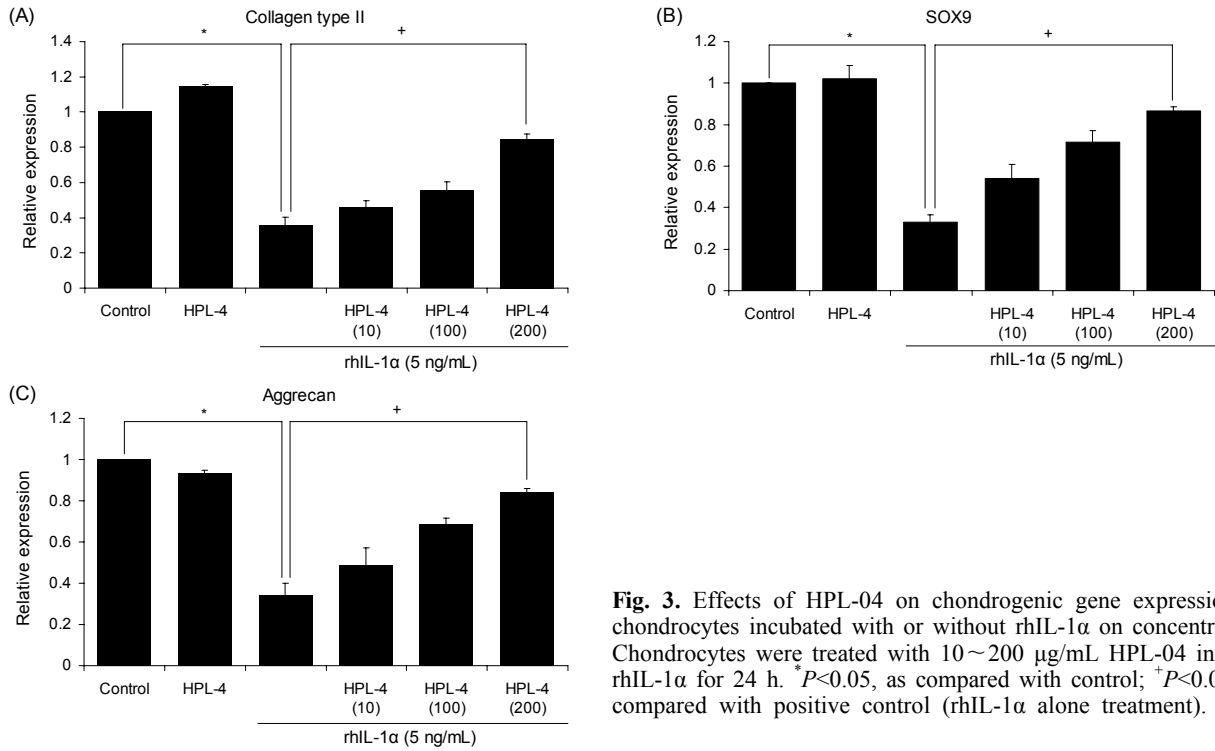
rhIL-1α(5 ng/mL)를 단독 처리한 군에서는 연골유전인자인 collagen type II, SOX 9 및 aggrecan의 활성화도가 감소하는 반면에 HPL-04(1~200 µg/mL)를 1시간 전처리 하고, rhIL-1α(5 ng/mL)를 24시간 처리한 군에서는 연골유전인자 collagen type II, SOX 9 및 aggrecan의 활성화도가 증가하는 것으로 보인다. 이 두 군을 비교하였을 때 rhIL-1α를 단독 처리한 군보다 HPL-04를 처리해준 군에서 연골형성유전인자인 collagen type II, SOX 9 그리고 aggrecan이 활성화되는 것으로 보아, HPL-04가 연골세포 보호효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 3).

**In vivo에서 염증성 인자인 MMP-2, 9의 활성화도 평가**

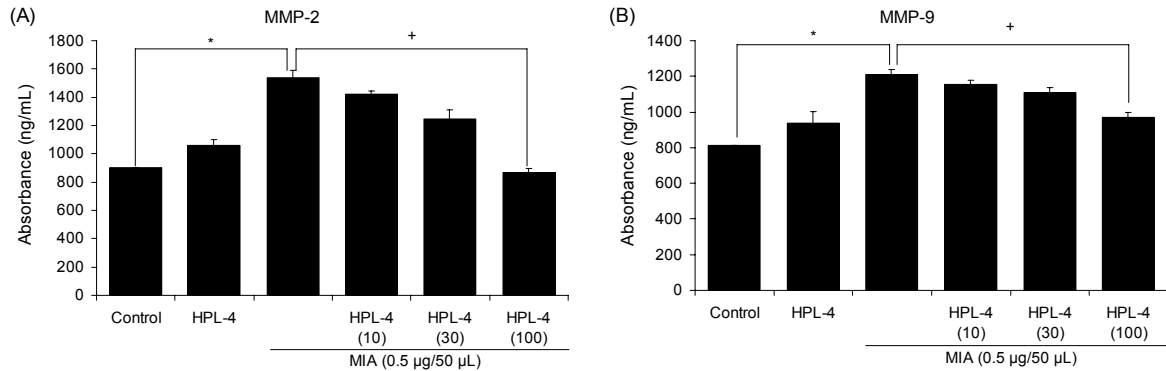
MIA는 연골과괴를 일으키는 물질이며 연골염증성 인자인 MMP-2, 9를 유발시킨다. MIA를 단독 투여한 실험군에



**Fig. 2.** Effects of HPL-04 on cell viability and MMP-2, 9 activity in chondrocytes incubated with or without rhIL-1α on concentration. (A) Chondrocytes were treated with 1~200 µg/mL HPL-04 for 24 h. The cell viability was assessed with a MTT assay. (B) Chondrocytes were treated with 1~200 µg/mL HPL-04 in with rhIL-1α for 24 h. (C, D) Chondrocytes were treated with 10~200 µg/mL HPL-04 in with rhIL-1α for 24 h. MMP-2, 9 activity was assessed with ELISA kit. \**P*<0.05, as compared with control; †*P*<0.05, as compared with positive control (rhIL-1α alone treatment).



**Fig. 3.** Effects of HPL-04 on chondrogenic gene expression in chondrocytes incubated with or without rhIL-1 $\alpha$  on concentration. Chondrocytes were treated with 10~200  $\mu$ g/mL HPL-04 in with rhIL-1 $\alpha$  for 24 h. \* $P$ <0.05, as compared with control; + $P$ <0.05, as compared with positive control (rhIL-1 $\alpha$  alone treatment).



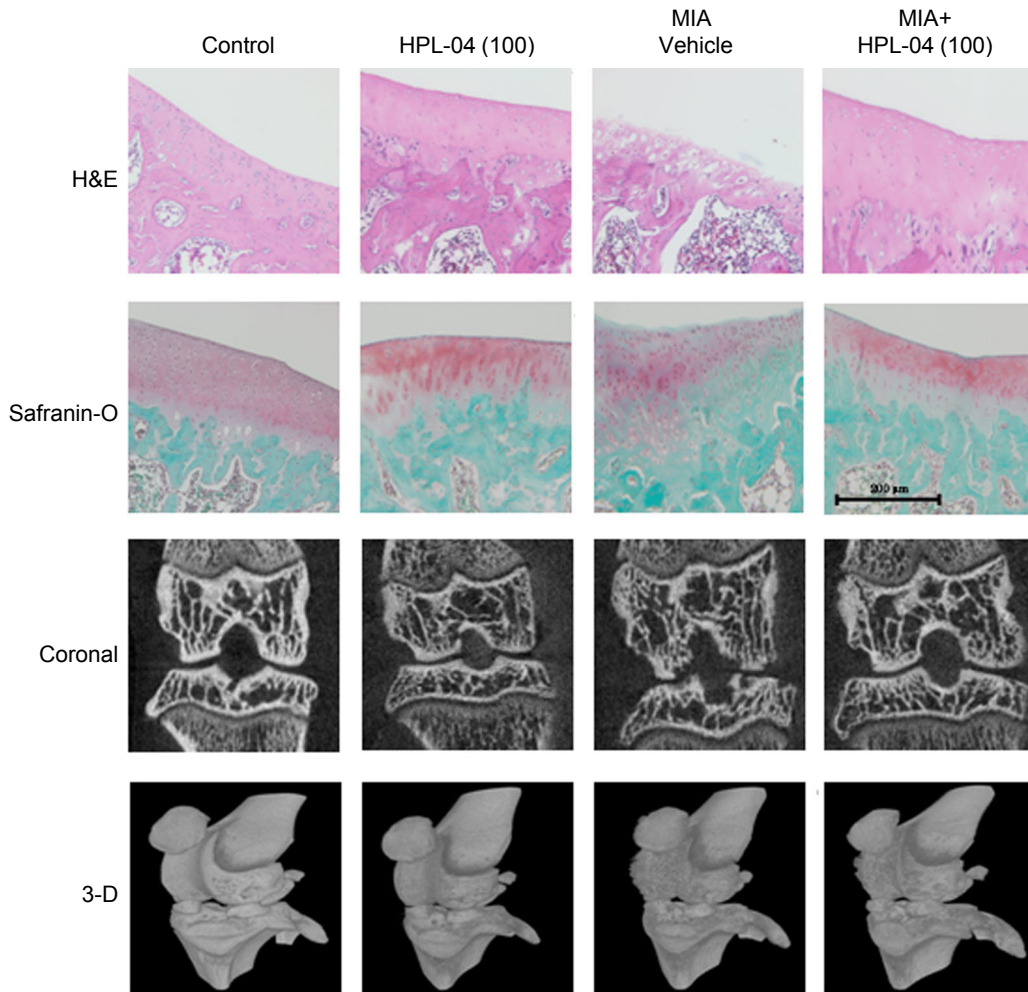
**Fig. 4.** Effects of HPL-04 on cartilage MMP-2, 9 activity on MIA-treated knee joint. Rats were administrated with 10~100 mg/kg HPL-04 for 4 weeks prior to MIA treatment. MMP-2, 9 activity was assessed with ELISA kit. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=5). \* $P$ <0.05, as compared with control; + $P$ <0.05, as compared with positive control (MIA alone treatment).

서는 MMP-2, 9가 증가하였고 HPL-04(10, 30, 100 mg/kg)를 4주간 투여 후 rhIL-1 $\alpha$ (5 ng/mL)를 24처리한 군에서는 MMP-2, 9가 감소하는 것이 보인다. 본 실험의 결과 HPL-04가 MIA에 의해 유발된 염증성 인자인 MMP-2, 9의 활성도를 감소시키는 것으로 사료된다(Fig. 4).

**조직학적 평가**

본 연구에서는 MIA로 유도된 골관절염에 HPL-04가 미치는 영향을 확인하기 위하여 골관절염 유발 4주째 실험 종료 후 각 실험군의 무릎관절 H&E 염색을 실시하여 조직학적으로 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과 MIA 주입 후 HPL-04 투여 4주째인 골관절염 유발군의 무릎관절에서는 관절연골의 파괴와 골 침식 등의 소견을 관찰할 수 있었으며 HPL-04

투여군에서의 연골은 골 침식 등의 연골의 변성이 정상군과 유사한 것을 확인할 수 있었다. 또한 safranin-O fast green 염색을 실시하여 proteoglycan의 함유량을 확인하였다. 연골의 침식 정도를 관찰한 결과 정상군의 관절연골은 적색으로 전 층이 염색되어 proteoglycan 함유량이 풍부한 상태로 관찰되었으며 MIA 투여군에서는 관절연골의 파괴나 미란이 심하고 정상군에 비해서 proteoglycan의 소실이 많았다. HPL-04 투여군에서는 정상군과 유사하게 연골의 손상이 회복되었으며 proteoglycan의 소실이 줄어들었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 마지막으로 전체적인 pathologic finding scores를 볼 때 MIA 0.5 mg/50  $\mu$ L 단독 처리군과 HPL-04 처리군에서 각각 15.80 $\pm$ 0.50과 10.40 $\pm$ 0.40의 수치가 나왔다(Table 3). 따라서 본 연구 결과 HPL-04는



**Fig. 5.** Effect of HPL-04 on MIA-treated degenerative osteoarthritis. Histopathological (H&E and safranin-O stain) and micro-CT (coronal and 3D analyses) evaluation of MIA-injected knee joint. MIA-treated cartilages represent severely damaged cartilage showing marked cartilage loss, fibrillation and the depletion of proteoglycan (H&E and safranin-O stain). Micro-CT of MIA-treated knee joint shows a severely damaged joint with rough edges around the tibia and femur, indicative of bone lysis, swelling and tendency of patellar displacement. However, these damages were reduced significantly by treatment with 100 mg/kg HPL-04. Scale bar: 200  $\mu$ m.

MIA에 의해 유도된 골관절염에서 proteoglycan의 소실을 줄임으로써 퇴행성 관절염을 완화시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

### 골소주 평가

Micro-CT 횡단면 영상에서 경골 골단의 원통형 VOI에서 얻은 골소주 지표 값들에 대해 MIA 단독 투여군과 HPL-4 투여군의 슬관절을 비교하였을 때 BV, BV/TV, Tb.Th 수치는 MIA 단독 투여군에서 증가하는 것이 관찰되었고 Tb.N과 Tb.Sp 값은 감소하는 경향을 보였으나, MIA 투여 후 HPL-4 투여군에서는 BV, BV/TV, Tb.Th 수치를 정상군에 가깝게 감소시켰으며 Tb.N과 Tb.Sp 값은 정상군에 가깝게 수치를 증가시켰다(Fig. 6). 결과적으로 골소주를 비교 분석한 결과 HPL-04 투여는 MIA에 의해 유발된 경골 골단의 여러 지표의 변화를 억제해주는 것으로 사료된다.

### 고 찰

퇴행성 관절염 환자의 80% 이상이 움직임의 제한을 겪고 있으며, 25%에서는 일상생활 수행에도 영향을 받고 있다. 퇴행성 관절염은 관절연골세포와 세포 외 기질간의 형태적, 생화학적, 분자적 그리고 생역학적 변화가 분명하고 임상적으로 관절통, 압통, 움직임의 제한, 뼈 마찰음, 염증 등을 특징으로 한다(17). HPL-04에서 많은 부분을 차지하는 해동피의 주성분으로는 saponin, phenolic 배당체 등의 성분이 알려져 있으며 사포닌 성분 가운데 kalopanaxsaponin A가 분리되었으며 류마티스성 관절염에 억제효과가 있다는 연구가 있다(18). 해동피는 소염작용, 진통작용, 항기생충작용 등이 알려져 있으며 민간에서는 해동피를 신경통의 치료 및 당뇨병과 성인병 치료에 널리 사용되고 있다(18). 실제 임상에서 퇴행성 관절염 환자에게 여러 가지 한약성분들이

**Table 3.** Summary of microscopic findings

	MIA	
	Vehicle	HPL-4 (100 mg/kg)
Structural changes in the joint		
Surface irregularities		
	+	0/5
	++	0/5
	+++	5/5
Average pathology score		3
Fibrillation of cartilage surface		
	+	0/5
	++	1/5
	+++	4/5
Average pathology score		2.8
Disorganization of chondrocytes		
	+	1/5
	++	2/5
	+++	2/5
Average pathology score		2.2
Exposure of subchondral bone		
	+	1/5
	++	1/5
	+++	2/5
Average pathology score		1.8
Degeneration/necrosis		
	+	0/5
	++	0/5
	+++	5/5
Average pathology score		3
Safranin-O staining		
Reduction of staining in cartilage		
	+	0/5
	++	0/5
	+++	5/5
Average pathology score		3
<b>Total pathology score (average±SE)</b>		<b>15.80±0.50</b>
		<b>10.40±0.40**</b>

+: mild, ++: moderate, +++: severe. \*\*Significantly different ( $P<0.01$ ) from vehicle-treated MIA.

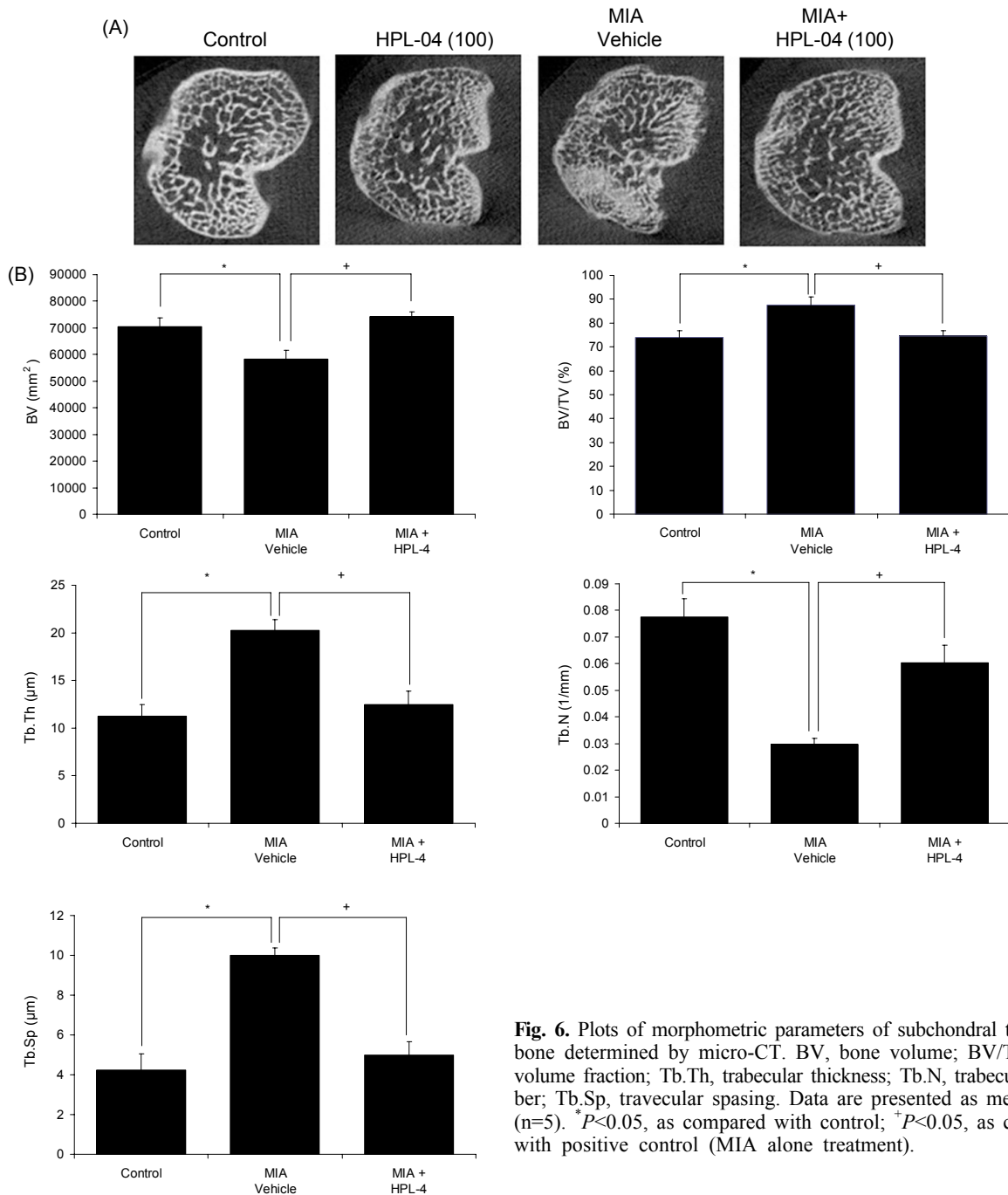
치료에 이용되고 있으나 해동피를 포함하는 기능성 복합처방을 가지고 연골세포와 동물실험에서의 평가는 미비하다.

연골의 항상성 유지에 중요한 연골세포의 변화와 사멸로 인하여 collagen type II, aggrecan, SOX 9 등 세포 외 기질의 생산이 감소하고 분해가 촉진되면 연골의 기본구조가 파괴되어 관절은 체중부하를 견디지 못한다(19). 본 실험에서 연골조직세포에 대한 rhIL-1 $\alpha$  5 ng/mL의 처리는 유의적인 collagen type II의 발현을 감소시킨 것으로 확인되었고 (Fig. 3A), HPL-04를 처리한 결과 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 거의 정상세포의 수준으로 유의적인 증가를 나타낸 것이 확인되었다. 또한 HPL-04를 처리한 후 rhIL-1 $\alpha$ 를 처리하여 SOX9 유전자의 발현을 측정된 결과 200  $\mu$ g/mL 범위에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며 (Fig. 3B), HPL-04를 처리한 후 rhIL-1 $\alpha$ 를 처리하여 aggrecan의 발현을 측정된 결과 200  $\mu$ g/mL 범위에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 3C). 염증성 관절에서 연골 및 골 파괴에 중요한 역할을 하는 것이 matrix metalloproteinase(MMP)

같은 단백 분해 효소이며 그 작용은 tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPS) system에 의해 길항된다(20). MMP는 생체 내에서 extracellular matrix protein으로 작용하고 골관절염에서는 proteoglycan의 분해와 관련이 있으며(21), MMP 활성 조절이 관절염 치료에서 중요하다 (22). 본 실험에서 MMP-2, 9의 유전자 발현을 측정된 결과, 전반적으로 rhIL-1 $\alpha$ 의 처리는 MMP-2, 9의 발현이 정상 세포군에 비해 증가한 것으로 확인되었다. 반면에 MMP-2, 9의 두 경우 HPL-04를 처리한 결과, rhIL-1 $\alpha$  단독 처리군에 비해 HPL-04 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 정상 세포군의 수준으로 유의성 있게 감소시킨 것으로 확인되었다 (Fig. 2C, D). 이러한 결과는 HPL-04가 MMP-2, 9의 유전자 발현을 억제함으로써 연골세포조직의 파괴를 억제시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.

*In vitro* 상의 연구 결과를 토대로 하여 *in vivo* 상에서 사람과 유사한 퇴행성 골관절염 동물모델을 제작하여 조직학적 평가를 실시하였다. 골관절염 유발 물질로 사용된 MIA





**Fig. 6.** Plots of morphometric parameters of subchondral trabecular bone determined by micro-CT. BV, bone volume; BV/TV, bone volume fraction; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular spacing. Data are presented as mean±SEM (n=5). \**P*<0.05, as compared with control; +*P*<0.05, as compared with positive control (MIA alone treatment).

는 관절연골세포의 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발 실험에서 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등이 인체의 골관절염과 매우 유사하다고 알려져 있다(23). MIA에 의한 골관절염은 proteoglycan의 소실(24)과 연골 및 연골하골의 기질 붕괴가 일어나며 MMP, 아교질 분해 효소, gelatinase의 활성이 증가한다(25). 또한 파골세포와 골아세포의 활동이 증가하면서 관절연골의 소실로 인해 연골하골에 부하가 증가하여 변형 및 경화와 골극 형성 등이

보고되고 있다(19,26).

본 연구에서도 *in vitro* 실험 결과와 유사한 결과를 보였다. 동물실험에서 MMP-2, 9의 경우도 MIA(0.5 mg/50 µL) 단독 처리군에 비해 HPL-04 100 mg/kg의 농도에서 정상군의 수준으로 유의성 있게 감소가 확인되었다(Fig. 4A, B). Micro-CT 촬영 분석 결과 HPL-04군이 대조군에 비해 연골량 파괴가 현저하게 감소하였으며 H&E 및 safranin-O 염색을 통한 병리·조직학적 검사에서도 HPL-04군이 증가된 proteoglycan 양과 감소된 염증세포 소견을 보여 활막의 손상 정도를 감소시켰다(Fig. 5). 또한 골소주 지표 값들을



분석한 결과에서는 BV, BV/TV, Tb.Th 수치는 MIA 단독 투여군에서 증가하는 것이 관찰되었고 Tb.N과 Tb.Sp 값은 감소하는 경향을 보였으나, MIA 투여 후 HPL-04 투여군에서는 BV, BV/TV, Tb.Th 수치가 정상군에 가까운 수치를 보였으며 Tb.N과 Tb.Sp 값도 정상군에 가까운 수치로 회복되었다(Fig. 6B). 이는 HPL-04가 뼈와 연골의 침윤을 감소시켜 골관절염의 진행을 억제하고 있다는 것을 의미한다.

본 연구의 결과를 바탕으로 HPL-04는 MIA로 유도된 퇴행성 관절염에서 연골의 변성과 퇴행을 줄이고 proteoglycan의 소실을 줄이는 등 퇴행성 골관절염 예방과 치료에 뛰어난 효과가 있다고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 HPL-04가 골관절염의 예방 및 치료 약물로서의 가능성을 탐색하여 다음과 같은 결론을 얻었다. HPL-04는 연골세포 생존율과 연골형성과 관련된 collagen type II, SOX 9 그리고 aggrecan의 유전자 발현을 유의성 있게 증가시킬 뿐만 아니라 염증성 인자와 관련 있는 MMP-2, 9도 유의성 있게 감소시켰다. HPL-04는 MIA에 의해 유도된 퇴행성 골관절염에서 관절연골의 파괴와 골 침식 등 연골의 변성을 억제했으며 proteoglycan의 소실을 유의성 있게 감소시켰다. 이에 본 연구는 HPL-04가 부작용이 적고 약리 효과가 뛰어나 골관절염 예방 및 치료제 개발에 활용될 수 있을 것으로 본다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부, 한국산업기술진흥원, 호남광역경제권 선도산업지원단의 광역경제권 선도산업 육성사업으로 수행된 연구결과임.

## REFERENCES

- Jang JH, Kawakita K, Hahn SK, Park HJ, Lee SD, Kim YS, Takahashi N, Shichidou T, Itoh K, Sumiya E, Furuya E, Yamashita H. 2006. Report: report of the 3rd Japan-Korea workshop on acupuncture and EBM-protocol development for the acupuncture trial on the osteoarthritis of the knee. *J Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society* 23: 239-254.
- Lee KG, Huang DS, Yu YB, Ma JY, Ha HK, Shin HK. 2006. A study on compositions, dosages and usages of Sagunjang, Samultang, Palmultang, Sipjeondaebotang in literature. *J Oriental Medical Classics* 19: 219-225.
- Lee RM, Nam SS, Lee SH, Kim YS. 2009. Research trends in evidence based medicine on acupuncture - Randomized controlled trial-. *J Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society* 26: 147-158.
- Jang YO. 2007. Pathogenesis of osteoarthritis. *Diagnosis and Treatment* 27: 395-399.
- Jhun HJ, Ahn K, Lee SC. 2010. Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and nutrition examination survey. *Anesth Pain Med* 5: 201-206.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Kaplan D, Koopman W, Longley III S, Mankin H, McShane DJ, Medsger Jr T, Meenan R, Mikkelsen W, Moskowitz R, Murphy W, Rothschild B, Segal M, Sokoloff L, Wolfe F. 1986. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 29: 1039-1049.
- The Korean Orthopaedic Association. 1994. *Orthopedics*. 4th ed. Newest Medicine Company, Seoul, Korea. p 1-910.
- Janf SK. 2007. The effect on intra-articular administration of hyaluronic acid and growth hormone on arthritis in osteoarthritis rat model. *MS Thesis*. Dongshin University, Naju, Korea.
- Das SK, Farooqi A. 2008. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 657-675.
- Yoon CH. 2012. Current clinical practice: osteoarthritis update. *Korean J Med* 82: 170-174.
- Wenz W, Breusch SJ, Graf J, Stratman U. 2002. Ultrastructural findings after intraarticular application of hyaluronan in a canine model of arthropathy. *J Orthop Res* 18: 604-612.
- Zahmatkash M, Vafaenasab MR. 2011. Comparing analgesic effects of a topical herbal mixed medicine with salicylate in patients with knee osteoarthritis. *Pak J Biol Sci* 14: 715-719.
- Lechner M, Steirer I, Brinkhaus B, Chen Y, Kirst-Dungl C, Koschier A, Grantschacher M, Neumann K, Zauner-Dungl A. 2011. Efficacy of individualized Chinese herbal medication in osteoarthritis of hip and knee: a double-blind, randomized-controlled clinical study. *J Altern Complement Med* 17: 539-547.
- Jang JK. 1994. *JoongKyoung collection*. Daesung press, Seoul, Korea. p 385.
- Herbal medical professor coeditorship. 1999. *Herbal medicine*. YoungLim, Seoul, Korea. p 1-775.
- Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, Tanaka H, Goda M, Fukunari A, Komatsu H. 2003. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 65: 1195-1199.
- An HJ, Lee CK, Park JH, Kim KH, Lee WR, Park IY, Han SM, Lee KG, Park KK. 2012. Effects of bee venom on papain-induced osteoarthritis in an animal model. *Korean J Pharmacogn* 43: 167-172.
- Kim TJ. 1996. *Korean resources plants*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 169.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. 2003. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31: 619-624.
- Bresnihan B. 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26: 717-719.
- Nagasa H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494.
- Halliwel B. 2000. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis* 6: 136-137.
- Cho HJ, Chang CB, Jung JW, Seong SC, Kim TK. 2009. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis in elderly Koreans. *Knee Surgery & Related Research* 21: 223-231.
- Kim W, Choi J. 2010. Effects of bee venom and *Cervi cornu parvum* pharmacopuncture in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat. *The Korean Academy of*

- Oriental Rehabilitation Medicine* 20: 61-77.
25. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S, Taiwo YO. 2001. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 751-760.
26. van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. 1989. Development of osteoarthritis lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol* 135: 1001-1014.