

當歸四逆湯이 MIA로 유발된 골관절염 흰쥐에 미치는 영향

양두화 · 우창훈 · 김정민 · 안희덕
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of *Danggwisayeok-tang* (*Dangguisinitang*) on MIA-Induced Osteoarthritis Rats

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

Objectives The purpose of this study was to know the effects of *Danggwisayeok-tang* (*Dangguisinitang*) extract (DGSYT) on monosodium iodoacetate (MIA)-induced rat osteoarthritis.

Methods For this purpose, rats were divided into 5 groups. Normal group was not injected with MIA and orally administered any medication. Control group was injected with MIA and not orally administered any medication. DGSYT100 group was injected with MIA and orally administered 100 mg/kg of DGSYT. DGSYT300 group was injected with MIA and orally administered 300 mg/kg of DGSYT. JoinsT group was injected with MIA and orally administered 20 mg/kg of Joins tablet. DGSYT100 and DGSYT300 groups were orally administered DGSYT during a week before and 3 weeks after based on the day MIA injected. The changes of hepatotoxicity, nephrotoxicity, relative hind paw weight distribution, cytokine in serum, cytokine messenger ribonucleic acid (mRNA) in joint tissue and histopathological observation (Hematoxylin & Eosin and Safranin-O staining) were measured.

Results Alanine aminotransferase (ALT) levels of DGSYT100, DGSYT300 and JoinsT groups were increased significantly, but these results were within normal range. Aspartate aminotransferase (AST) and creatinine levels of all groups were not changed significantly. In the change of relative hind paw weight distribution, DGSYT300 and JoinsT groups were decreased significantly 14 and 21 days after MIA injected. Interleukin-1 β (IL-1 β) and Interleukin-6 (IL-6), Leukotriene B₄ and Osteocalcin levels of DGSYT300 and JoinsT groups were decreased significantly. In measurement of IL-1 β and nitric oxide synthase-II mRNA relative quantitative of control, DGSYT100, DGSYT300 and JoinsT groups were decreased significantly. In measurement of TNF- α , IL-6 and Cyclooxygenase-2 mRNA relative quantitative of control, DGSYT300 and JoinsT groups was decreased significantly. In histopathological observation of knee, synovial tissue, cartilage and proteoglycan of DGSYT100, DGSYT300 and JoinsT were well preserved compared with control group.

Conclusions According to the results, DGSYT has anti-inflammation and pain relief effects. So it should be suppressed progression of arthritis in MIA-induced osteoarthritis rat. (**J Korean Med Rehab 2015;25(2):37-50**)

RECEIVED March 16, 2015
ACCEPTED April 1, 2015

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 708-828, Korea

TEL (053) 770-2109
FAX (053) 770-2055
E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2015 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Danggwisayeok-tang* (*Dangguisinitang*), Osteoarthritis, Monosodium iodoacetate (MIA), Anti-inflammation effect

서론»»»»

퇴행성 관절염이라고도 불리는 골관절염은 국소적인 관절 부위의 연골이 점차적으로 소실되고 이와 동반된 2차적인 변화를 일으키는 질환으로, 과거에는 노화 현상의 일부로 생각되었지만 최근에는 관절 연골의 변화를 일으키는 질환이라고 인식되고 있다¹⁾.

골관절염의 가장 위험한 인자는 연령이며, 노인에게 호발하는 가장 흔한 만성 관절 질환으로 2012년에 실시된 국민건강영양조사에 따르면, 연령별 골관절염의 유병율이 50대 3.0%, 60대 12.1%, 70대 22.2%로 나타나는 것으로 조사되어²⁾, 노인 인구가 증가함에 따라 골관절염의 유병율도 증가될 것으로 예상된다. 더욱이 우리나라의 경우 전 세계적인 고령화 추세와 함께 고령인구가 2018년 14.3%, 2026년에는 20.8%에 이르는 초고령 사회가 도래할 것이라 전망되고 있어³⁾, 앞으로도 질환의 발생 빈도는 더욱 높아질 것으로 예상된다.

한의학에서는 골관절염을 痺證의 범주로 인식하여 왔다. 痺證이란 슬관절에 風, 寒, 濕의 邪氣가 침범하여 關節酸楚, 重着, 疼痛, 腫大 및 활동장애를 일으키는 것으로 관절의 風濕을 없애고 溫養시키는 것을 치료법으로 한다⁴⁾.

當歸四逆湯은 『傷寒論 厥陰病條文』⁵⁾에서 처음 언급된 처방으로 “手足厥寒, 脈細欲絕者, 當歸四逆湯主之.”라 하였으며, 溫經散寒하여 養血通脈의 효능이 있어 血虛한데 寒邪를 받아 陽虛血虧하여 四肢를 溫養하지 못해 經脈의 血行이 不利하여 발생하는 증상을 치료하는 처방이다⁶⁾. 當歸四逆湯은 當歸, 桂枝, 白芍藥, 細辛, 甘草, 通草, 大棗로 구성되어 있으며 각 한약재는 골관절염에 대한 항염증 및 진통 효과를 가지고 있기 때문에⁷⁻¹³⁾ 본 처방도 골관절염의 치료에 응용될 수 있을 것이라 생각되었다.

이에 저자는 當歸四逆湯의 항염증 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 흰쥐를 MIA로 골관절염을 유발시켜 뒷다리 체중부하 검사, 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정, 슬관절 조직의 cytokine 유전자 발현 분석과 연골의 병리조직학적 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 시약 Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, Trichloroacetic acid, Isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), 2-isopropanol, Monosodium iodoacetate (MIA)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)은 Life Technologies사(NY, USA) 제품을, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit로 Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6)는 R&D system사(MN, USA) 제품을 사용하였고 Leukotriene B₄ (LTB₄), Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 Cayman사(Michigan, USA), Nitric Oxide (NO) Detection Kit는 Intron사(cat. No. 21021, USA), Osteocalcin은 TaKaRa사(MK147, Japan) 제품을 사용하였다. Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색과 Safranin-O 염색에는 Hematoxylin (Merck Co., Germany), Eosin Y (Wako Co., Japan)와 Safranin-O (Merck Co., Germany), 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 동물

샘타코바이오코리아사(오산, 한국)에서 공급하는 7주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (175~200 g)을 공급받았고, 실험 당일까지 고형사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도(22 \pm 2 $^{\circ}$ C), 습도(55 \pm 15%)가 조절된 사육실에서 12시간 light-dark cycle 환경을 유지하며 1주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인(승인번호: DJUAR2014-010)을 받았다.

3) 약제

본 실험에서 사용한 처방의 약재들은 《新古方撰次》¹⁴⁾에 의거하여 옴니허브(대구, 한국)에서 구입, 정선 후 사용하였으며 1첩당 분량은 다음과 같다(Table 1).

當歸四逆湯의 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여

Table I. Composition of *Danggwisayeok-tang* (*Danguisinitang*)

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (g)
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	6
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	6
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6
細辛	<i>Asari Herba Cum Radice</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
通草	<i>Tetrapanacis Medulla</i>	4
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	12
Total amount		44

열탕 추출기(대웅, DWT-1800T, 한국)에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 當歸四逆湯 추출물(DGSYT 14.4 g)을 냉동 보관(-84°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), Clean bench (Visionscientific Co., 한국), Autoclave (Sanyo, Japan), Micro-pipet (Gilson, France), Water bath (Vision scientific Co., 한국), Vortex mixer (Vision scientific Co., 한국), Spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Centrifuge (Sigma, USA), Deep-freezer (Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Molecular devise, USA), Ice-maker (Vision scientific Co., 한국), Homogenizer (OMNI, USA), Plateshaker (Lab-Line, USA), Incapacitance analgesy meter (IITC Inc, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 當歸四逆湯 약물 투여

실험군은 골관절염을 유발시키지 않은 정상군(Normal), MIA로 골관절염 유발한 대조군(Control), MIA로 골관절염 유발 후 當歸四逆湯 100 mg/kg 투여군(DGSYT100), MIA로 골관절염 유발 후 當歸四逆湯 300 mg/kg 투여군(DGSYT300), 양성대조군으로 MIA로 골관절염 유발 후

Joins Tablet (J200, SK케미칼, 경기, 한국) 20 mg/kg 투여군(JoinsT)으로 나누어 5마리씩 배정하였고, 배정받은 날로부터 4주간 경구 투여 하였다. 當歸四逆湯의 희석은 0.25% Carboxymethylcellulose (CMC, Sigma Co., USA) 용액에 녹여서 투여했고, MIA 유도 골관절염 대조군은 0.5% CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물 투여는 금속제 존대(sonde)를 이용하여 위내로 강제 경구 투여하였다.

2) MIA에 의한 골관절염 유발

각 실험군에 실험 물질을 경구 투여한 날로부터 7일 후 흰쥐를 마취제 Ketamine (SH35361504, 50 mg/ml, 유한양행, 한국) 0.5 ml과 Rompun (41882, 바이엘코리아, 한국) 0.2 ml를 혼합 후 복강에 주사하여 마취시킨다. 마취 후 Sprague-Dawley rat의 왼쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA를 0.3 ml 주사기 (BD 31 G Ultra-Fine II, USA)를 사용하여 무릎 관절강 내에 0.9% saline으로 희석하여 50 μ l (60 mg/ml)씩 투여하였다.

3) 뒷다리 체중 부하 측정

뒷다리 체중 부하 측정은 Incapacitance tester를 사용하여, 흰쥐의 배가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 오른쪽, 왼쪽의 발무게(g)를 각각 측정하였다. 실험결과는 관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량에 대한 정상 뒷다리의 체중 부하량을 계산하여 체중 부하 비율을 계산하고, 정상군의 체중 부하 비율에 대한 각 군의 체중 부하 비율을 계산하여 평균(%) \pm 표준오차로 표시하였다. 시험 물질은 오전에 투여하고 측정은 오후에 하는 것으로 하며, 뒷다리 체중 부하 측정일은 MIA 유발 후 0, 7, 14, 21일째 되는 날에 각각 시행하였다.

$$\text{체중부하비율} = \frac{\text{정상 뒷다리의 체중부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중부하량}}$$

$$\text{상대적 체중 부하} = \left(\frac{\text{각군의 체중부하 비율}}{\text{정상군의 체중부하 비율}} \right) \times 100$$

4) 체중 측정

체중은 MIA유발 후 0, 7, 14, 21일째 되는 날 오전 10시에 동물용 체중계(카스전자 저울, 한국)로 측정하여 기록하였다.

5) 식이효율 측정

1주일에 1회씩 식이섭취량(g)을 측정하였다. 식이섭취량은 MIA유발 후 0, 7, 14, 21일째 되는 날의 일정한 시간에 측정하여 일평균 섭취 식이량을 산출하였으며, 식이효율(food efficiency ratio)은 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어서 계산하였다.

$$\text{식이효율(\%)} = \frac{\text{총 체중 증가량}}{\text{총 식이 섭취량}} \times 100$$

6) 간 기능 및 신장 기능 분석

마취된 실험동물 심장에서 혈액을 10 ml를 syringe (21 G, 한국백신, 한국)로 취해 혈청분리용 tube에 담고, 혈청분리용 tube의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 이용하였다. 분리한 혈장(plasma)에서 간 기능의 지표인 Aspartate aminotransferase (AST)와 Alanine aminotransferase (ALT)를, 신장 기능의 지표인 Creatinine의 수준을 생화학 자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

7) 염증 cytokine 측정

채혈한 혈액으로부터 혈청을 분리한 뒤, 혈청 중 염증성 지표로서 IL-1 β , IL-6 단백질의 발현량을 ELISA법으로 측정하였다. 흰쥐용 IL-1 β , IL-6 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각각 IL-1 β , IL-6 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100 μ l씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

8) 염증 매개인자 측정

LTB $_4$, Osteocalcin 등의 염증성 매개인자들은 각각의 assay kit를 이용하여 농도를 측정하였다. 상기 ELISA법을 상세히 살펴보면, 먼저 코팅된 LTB $_4$, Osteocalcin의 96 well plate에 100 μ l씩 각각 흰쥐 혈청을 분주하고 실온에서 16시간 방치하였다. 다음으로, 상기 플레이트를 0.05%의 트윈(tween)이 포함된 PBST로 3회 이상 세척하고, 1%의 Bovine Serum Albumin를 함유한 PBS로 차단하였고, 실온에서 2시간 방치하였다. 다시, 각 well을 세척한 후 2차 항체 바이오틴(biotin)이 결합된 LTB $_4$, Osteocalcin를 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 이어서, 각 well을 다시 PBST로 세척하고, 아비딘(avidine)이 부착된 과산화효소를 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 마지막으로, well을 PBST로 세척한 다음, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonic acid)] 기질을 첨가하고 발색반응을 ELISA 판독기로 405 nm의 파장에서의 흡광도(OD)를 측정하였다.

9) 슬관절 조직 유전자 발현 분석

실험 종료 후 각 실험동물로부터 적출한 왼쪽 슬관절(knee) 조직에서의 유전자 발현 양상을 Real-time PCR 증폭법을 사용하여 관찰하였다. 흰쥐 관절조직 0.1 g을 RNazol^B (Tel-Test)용액으로 RNA를 추출한 뒤 One-step SYBR Green PCR kit (AB science)를 사용하여 cDNA 및 Real-time PCR 분석을 하였다. 활막조직(synovial tissue)에 RNazol^B 500 μ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 여기에 chloroform (CHCl $_3$) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1

μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 45분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다. Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. Rat probe 및 oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 (Table II).

유전자 발현은 internal standard로 TaqMan probe (FAM dye-labeled, ABI, USA)인 Mouse Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe set 을 사용하였고, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건을, pre-denaturation은 50°C에서 2분간, 94°C에서 10분간, 그리고 40 cycle을 95°C에서 15초간, 45°C에서 60초간 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR은 $y=x(1+e)^n$, x =starting quantity, y =yield, n =number of cycles, e =

efficiency로 계산하여 relative quantitative (RQ)를 측정하였다.

10) 조직병리학적 검사

실험 종료 후 슬관절 부위를 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% formalin 용액에 넣어 joint를 decalcification 시킨다. Radiographic technique을 이용하여 decalcification 유무를 확인한 후 parafin wax에 joint를 넣고 고정된 다음 coronal section을 실시하였다. Decalcification 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μm 의 크기로 자른 뒤, H&E 및 Safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증 세포의 조직 침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인할 수 있으며, Proteoglycan층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인할 수 있다.

3. 통계처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고 대조군과 약물 투여군의 측정치 및 오차를 근거로 SPSS의 11.0의 Student's t-test를 사용하여 $p<0.05$ 를 유의성이 있는 것으로 판단하여 통계처리 하였다.

Table II. Primer Sequence of Rat Probe & Oligonucleotide

Gene		Primer sequence
IL-1 β	Forward	5'-CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG-3'
	Reverse	5'-TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT-3'
IL-6	Forward	5'-TTCCTACCCCAACTTCCAATG-3'
	Reverse	5'-ATGAGTTGGATGGTCTTGGTC-3'
TNF- α	Forward	5'-GACCCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'
	Reverse	5'-TGCTACGACGTGGGCTACG-3'
NOS-II	Forward	5'-CTTTACGCCACTAACAGTGGCA-3'
	Reverse	5'-AGTCATGCTTCCCATCGCTC-3'
COX-2	Forward	5'-TGGTGCCGGTCTGATGATG-3'
	Reverse	5'-GCAATGCGGTTCTGATACTG-3'
GAPDH-VIC	Probe	The Applied Biosystems [®] Rat GAPD (GAPDH) Endogenous Control (VIC [®] /MGB Probe, 4352338E)

IL: interleukin, TNF- α : Tumor necrosis factor- α , NOS-II: Nitric oxide synthase-II, COX-2: Cyclooxygenase-2, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

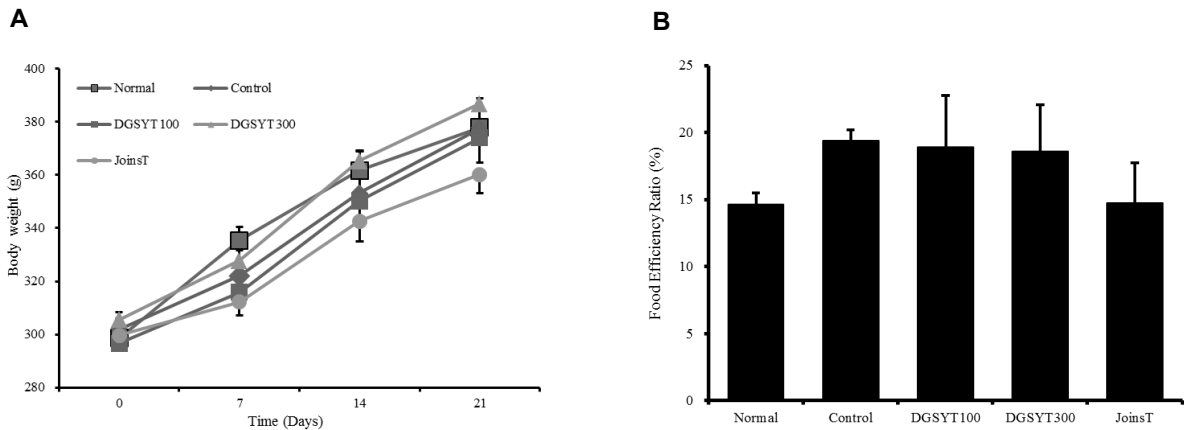


Fig. 1. The effects of body weight for 3 weeks (A) and food efficiency ratio (B) in MIA-induced osteoarthritis rat. The results are expressed as mean±SD. There is no significant difference in rats groups. Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

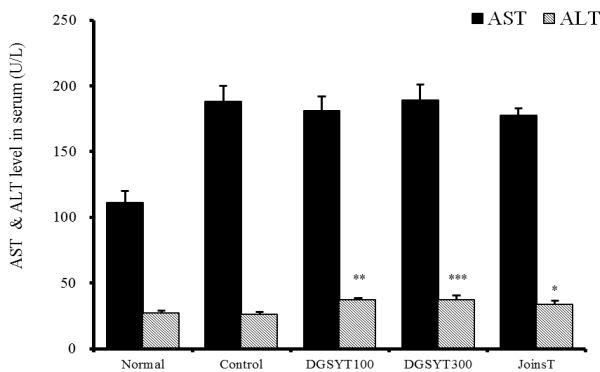


Fig. 2. The effects of DGSYT on the AST and ALT in MIA-induced osteoarthritis rat. The results are expressed as mean±SD. Statistically significant value was calculated by compared with Control by student's t-test (**p<0.01, ***p<0.001, *p<0.05). Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

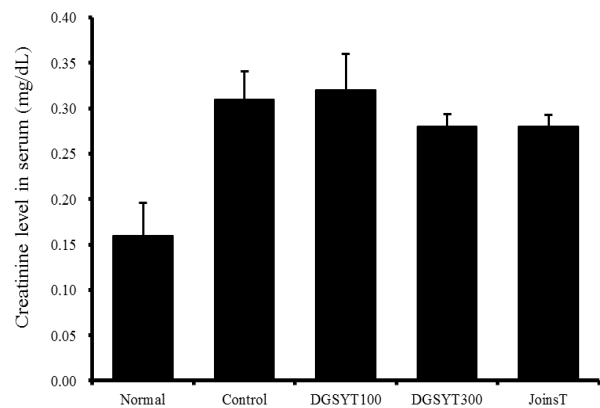


Fig. 3. The effects of DGSYT on the Creatinine in MIA-induced osteoarthritis rat. The results are expressed as mean±SD. There is no significant difference in rat groups. Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

결과»»»»

1. 체중 변화 및 식이 효율

MIA 유발 후 3주간의 체중 측정에서 모든 군에서 체중이 증가하였으며 각 군 간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1A).

식이 효율은 Normal 14.67±0.81, Control 19.40±0.80,

DGSYT100 18.95±3.81, DGSYT300 18.58±3.46, JoinsT 14.75±2.96으로 나타났으나 각 군 간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

2. 간 기능에 미치는 영향

혈청 중의 AST는 Normal 111.2±8.7, Control 188.0±12.2, DGSYT100 181.4±12.1, DGSYT300 189.0±10.6, JoinsT

177.8±5.1으로 나타났으나 유의성 있는 차이는 없었다 (Fig. 2).

혈청 중의 ALT는 Normal 27.0±2.1, Control 35.8±2.4, DGSYT100 37.2±3.3, DGSYT300 37.2±1.2, JoinsT 33.4±3.1로 나타났으며 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 Control에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2).

3. 신장 기능에 미치는 영향

혈청 중의 Creatinine은 Normal 0.16±0.036, Control 0.31±0.031, DGSYT100 0.32±0.040, DGSYT300 0.28±0.014, JoinsT 0.28±0.013로 나타났으며 Control에 비하여 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 3).

4. 뒷다리 체중 부하의 변화

Normal의 뒷다리 체중 부하 비율을 100으로 하였을 때 각 군의 상대적 체중 부하의 변화를 측정한 결과, MIA 투여 7일 후에는 Control 332.4±131.1, DGSYT100 173.9±26.7, DGSYT300 112.0±5.0, JoinsT 152.7±18.9로 나타나 Control에 비해 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았으나, 14일 후에는 Control 192.4±13.5, DGSYT100 156.1±16.1, DGSYT300 124.8±10.4, JoinsT 114.6±3.6으로 나타나 DGSYT300과 JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있는 감소가 나타났고, 21일 후에는 Control 236.0±56.9, DGSYT100 127.1±8.4, DGSYT300 111.0±4.6, JoinsT 120.5±8.7으로 나타나 DGSYT300과 JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 4).

5. 염증 cytokine 및 매개 인자에 미치는 영향

1) IL-1 β

혈액 내 IL-1 β 를 측정한 결과 Normal 49.2±10.7, Control 355.0±52.6, DGSYT100 300.8±64.4, DGSYT300 197.1±26.1, JoinsT 140.6±16.3로 나타나 Control에 비하여 DGSYT300과 JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 5A).

2) IL-6

혈액 내의 IL-6를 측정한 결과 Normal 22.3±1.7, Con-

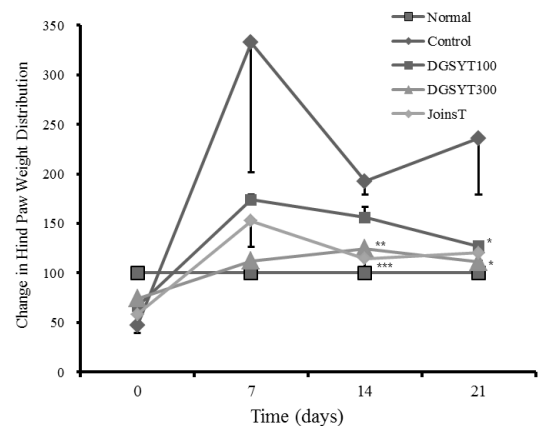


Fig. 4. The changes in relative hind paw weight distribution in MIA-induced osteoarthritis rat.

The results are expressed as mean±SD. Statistically significant value was calculated by compared with Control by student's t-test (**p<0.001, **p<0.01, *p<0.05)

Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg

trol 50.8±5.6, DGSYT100 46.2±6.9, DGSYT300 36.0±4.1, JoinsT 30.5±5.3로 나타나 DGSYT300과 JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 5B).

3) LTB $_4$

혈액 내의 LTB $_4$ 를 측정한 결과 Normal 0.66±0.08, Control 4.11±0.13, DGSYT100 3.73±0.31, DGSYT300 2.18±0.14, JoinsT 1.98±0.15로 DGSYT300과 JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5C).

4) Osteocalcin

혈액 내의 Osteocalcin을 측정한 결과 Normal 209.1±57.3, Control 983.7±52.7, DGSYT100 843.3±88.6, DGSYT300 689.2±97.2, JoinsT 662.2±70.0로 나타나 DGSYT300과 JoinsT에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5D).

6. 슬관절 조직 내 염증 인자의 유전자 발현에 미치는 영향

1) Tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA

관절 조직의 TNF- α mRNA 유전자 발현량은 Control

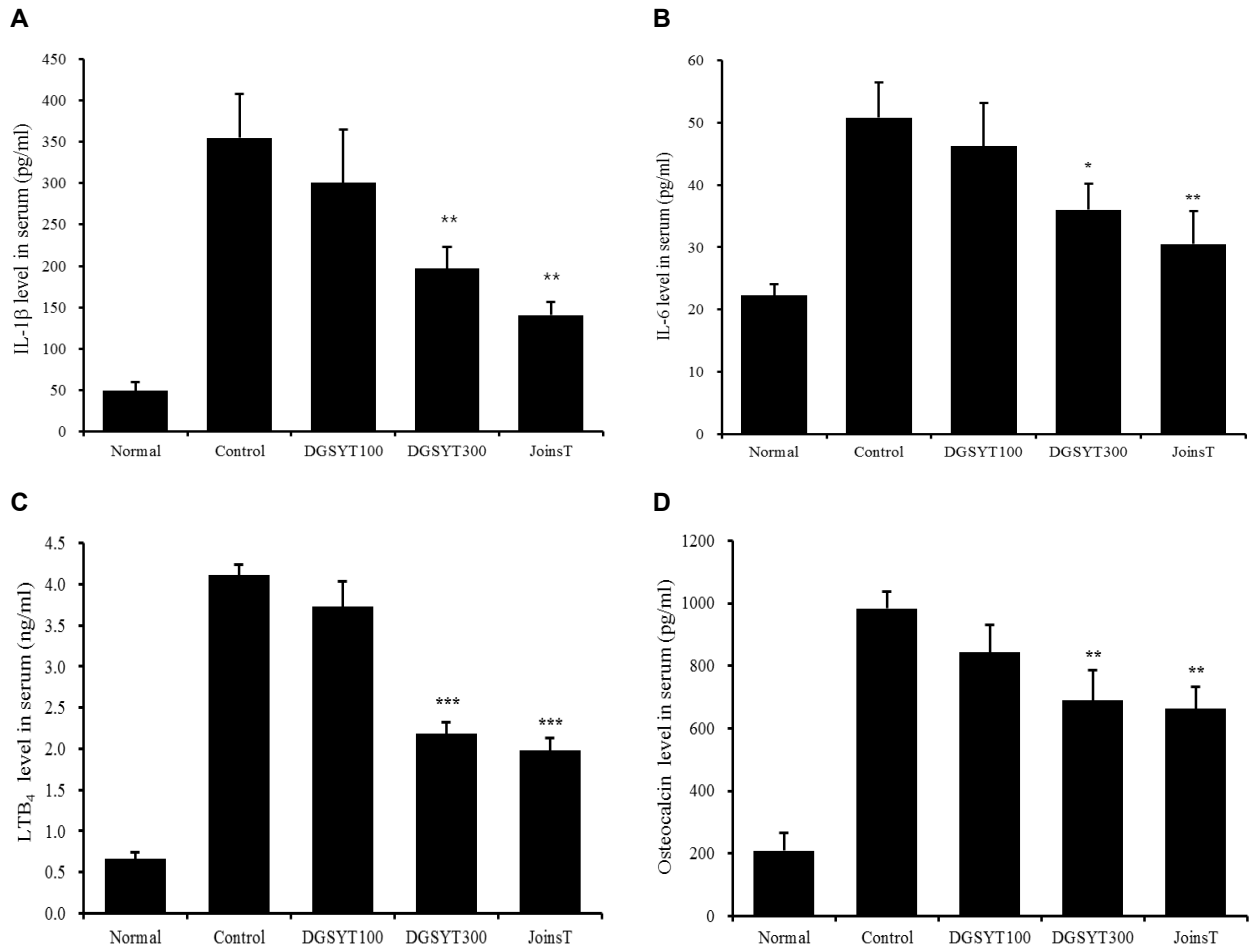


Fig. 5. The effects of DGSYT on the IL-1 β (A), IL-6 (B), LTB₄ (C) and Osteocalcin (D) level in serum in MIA-induced osteoarthritis rat. The results are expressed as mean \pm SD. Statistically significant value was calculated by compared with Control by student's t-test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)

Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

이 0.950 ± 0.050 일 때 Normal 0.613 ± 0.313 , DGSYT100 0.827 ± 0.135 , DGSYT300 0.596 ± 0.068 , JoinsT 0.492 ± 0.256 로 DGSYT300, JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있게 TNF- α mRNA 유전자 발현량의 감소를 나타내었다 (Fig. 6A).

2) IL-1 β mRNA

관절 조직의 IL-1 β mRNA 유전자 발현량은 Control이 1.009 ± 0.009 일 때 Normal 0.530 ± 0.218 , DGSYT100 0.754 ± 0.120 , DGSYT300 0.666 ± 0.049 , JoinsT 0.468 ± 0.209 으로 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 유의성 있게 IL-1 β mRNA 유전자 발현의 감소를 나타내었다(Fig.

6B).

3) IL-6 mRNA

관절 조직의 IL-6 mRNA 유전자 발현량은 Control이 0.938 ± 0.062 일 때 Normal 0.187 ± 0.166 , DGSYT100 0.832 ± 0.020 , DGSYT300 0.652 ± 0.123 , JoinsT 0.616 ± 0.069 으로 DGSYT300과 JoinsT에서 유의성 있게 IL-6 mRNA 유전자 발현의 감소를 나타내었다(Fig. 6C).

4) COX-2 mRNA

관절 조직의 COX-2 mRNA 유전자 발현량은 Control이

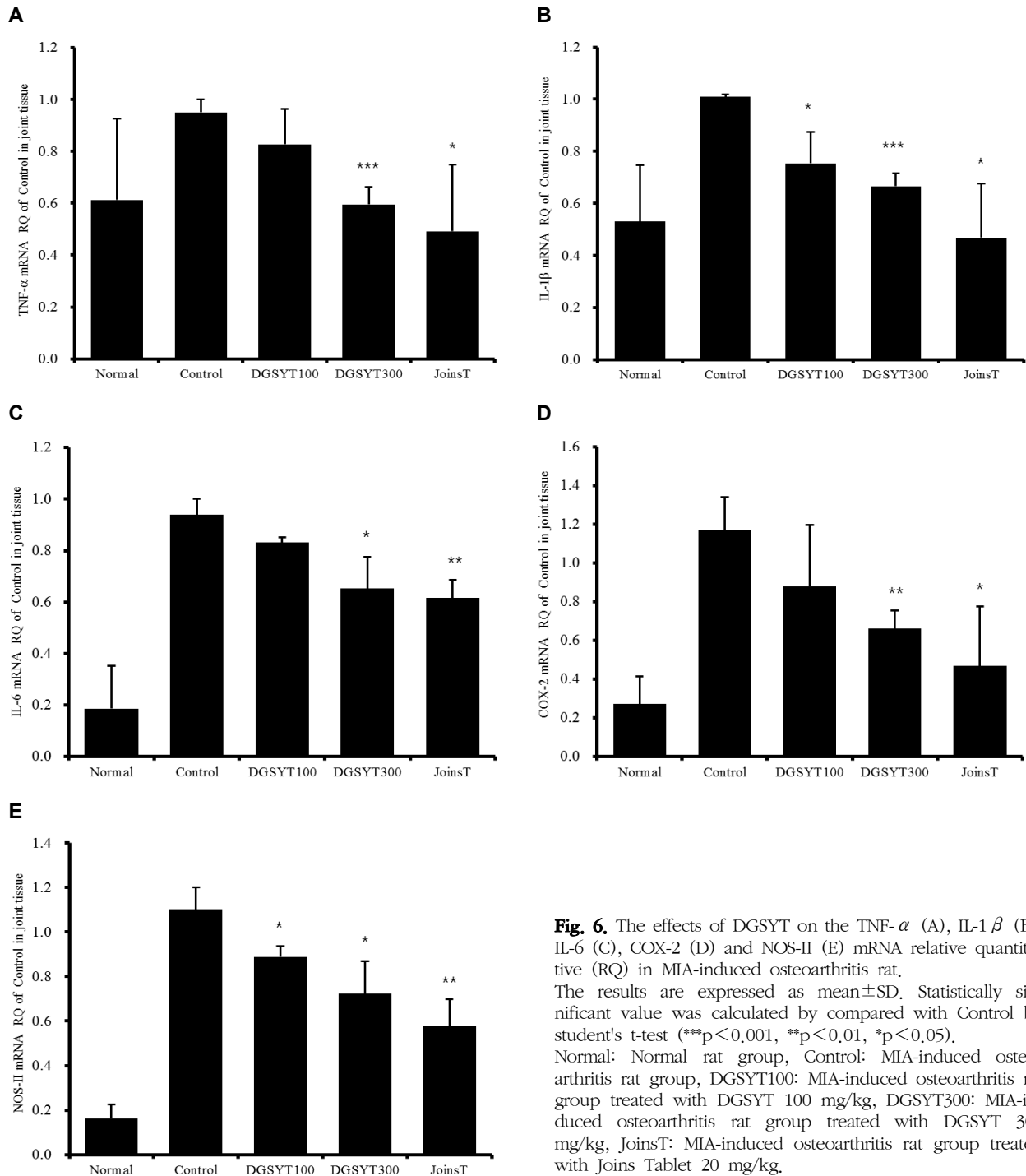


Fig. 6. The effects of DGSYT on the TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), COX-2 (D) and NOS-II (E) mRNA relative quantitative (RQ) in MIA-induced osteoarthritis rat.

The results are expressed as mean \pm SD. Statistically significant value was calculated by compared with Control by student's t-test (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

1.170 \pm 0.170일 때 Normal 0.272 \pm 0.143, DGSYT100 0.881 \pm 0.315, DGSYT300 0.660 \pm 0.095, JoinsT 0.467 \pm 0.308으로 DGSYT300과 JoinsT에서 유의성 있게 COX-2 mRNA 유전자 발현의 감소를 나타내었다(Fig. 6D).

5) NOS-II mRNA

관절 조직의 NOS-II mRNA 유전자 발현량은 Control이 1.101 \pm 0.101일 때 Normal 0.164 \pm 0.062, DGSYT100 0.889 \pm 0.046, DGSYT300 0.723 \pm 0.147, JoinsT 0.578 \pm

0.120로 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 Control에 비해 유의성 있게 NOS-II mRNA 유전자 발현의 감소를 나타내었다(Fig. 6E).

7. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

1) H&E 염색

무릎 관절 내 H&E 염색을 실시한 후 관찰한 결과, Normal의 활막 조직, 연골 등은 정상이었고 Control에서

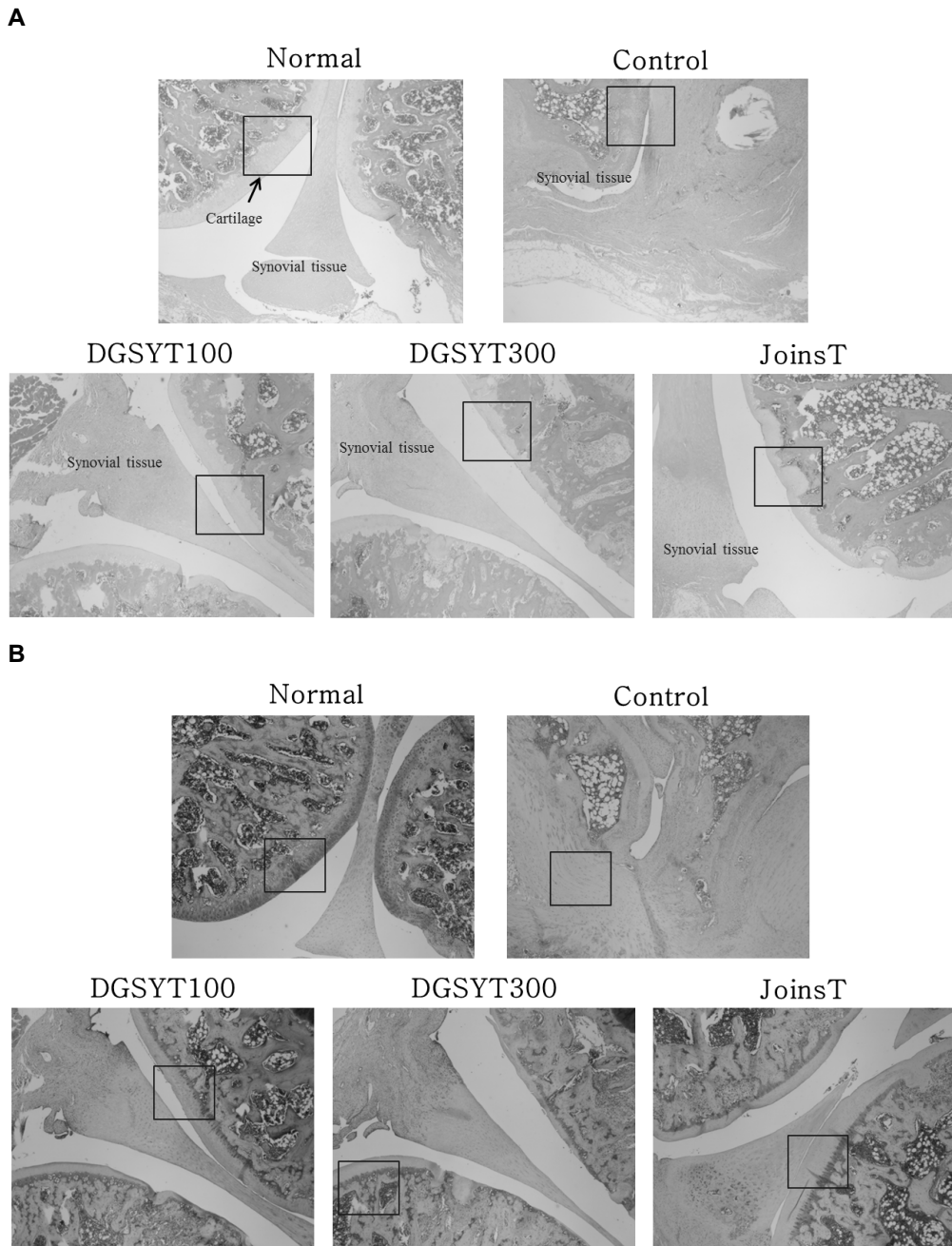


Fig. 7. The effects of DGSYT on joint in pathological observation (H&E (A) and Safranin-O (B) staining) in MIA-induced osteoarthritis rat.

Normal: Normal rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis rat group, DGSYT100: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 100 mg/kg, DGSYT300: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with DGSYT 300 mg/kg, JoinsT: MIA-induced osteoarthritis rat group treated with Joins Tablet 20 mg/kg.

는 골관절염이 유발되어 활막 조직과 연골의 변성 및 변형이 현저하게 나타났다. DGSYT100, DGSYT300, JoinsT의 활막 조직 및 연골 등은 Control과 비교하여 정상에 가까워 조직 손상이 상대적으로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 7A).

2) Safranin-O 염색

Safranin-O 염색 후 관찰한 결과, Normal의 관절 조직 및 proteoglycan은 정상적으로 관찰되었으나 Control에서는 골관절염이 유발되어 관절조직이 변형되고 proteoglycan의 대부분이 파괴되었다. 반면 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서는 Control에 비해 관절조직의 변형이 억제되고 proteoglycan의 소실도 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 7B).

고찰»»»»

골관절염은 서서히 발병하여 초기에는 관절의 강직감을 호소하고 점차적으로 진행되어 운동 시 관절에 통증을 일으키고 휴식에 의해 완화되며 부종과 기능저하를 발생시켜 일상생활에 장애를 일으키게 하는 질병으로⁴⁾, 골관절염의 치료는 관절의 강직감과 통증을 경감시키고, 가동능력을 유지 및 개선시켜 장애가 최소화 되도록 하는 것이 치료의 일차 목표이다¹⁵⁾.

골관절염에서 가장 큰 특징으로 나타나는 것은 연골의 파괴이다. 연골은 항상성을 유지하는 연골세포가 변화하고 사멸되어 Collagen, Proteoglycan 등의 세포외기질 생산이 감소하고 분해효소가 활성화되면서 연골이 파괴되게 된다. 이러한 연골파괴의 과정에서 IL-1 β , IL-6 등과 같은 cytokine의 역할이 중요하기 때문에 세포외기질 분해 효소나 cytokine을 억제하는 치료제가 개발되고 있다¹⁵⁾. 한의학에서는 한약을 이용한 골관절염의 실험¹⁶⁻¹⁹⁾이 다수가 있으며 본 실험에서는 當歸四逆湯의 골관절염에 대한 효과를 규명하고자 하였다.

본 실험에서 골관절염을 유도하기 위하여 흰쥐의 관절강에 주입할 약물로 MIA를 선택했다. MIA는 GAPDH 활동의 억제를 통하여 해당 작용을 멈추게 하고 연골세포의 대사를 억제해 세포사멸을 유도하고 연골의 기질을 감소시킨다. 이러한 변화가 진행되면서 관절 표면의 거칠기,

표면 세포층의 상실, 연골 밑 뼈의 노출, 윤활막의 손상 및 전반적인 성장억제를 일으키게 되기 때문에 MIA는 관절의 퇴행성 변화를 유발하는 대표적인 물질이라 할 수 있다²⁰⁻²²⁾. 그리고 이와 같은 연골 세포와 관절 연골의 변화가 사람의 골관절염에서 나타나는 과정과 매우 유사하며²³⁾, 농도의 조절을 통하여 다양하게 골관절염의 심한 정도를 유발시킬 수 있고, 관리하기가 용이하기 때문에²⁴⁾ 골관절염에 대한 한약의 치료 효과를 검증하기 위한 동물 연구에 자주 이용되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

본 연구에 사용된 當歸四逆湯의 처방은 當歸, 桂枝, 白芍藥, 細辛, 甘草, 通草, 大棗로 구성되어 있다. 이 중 當歸는 補血活血하고 行氣止痛하는 효능이 있으며⁷⁾, 염증 반응의 매개 물질인 NO, PGE₂, IL-6의 생성을 억제한다⁸⁾. 桂枝는 溫經通脈하여 關節痺痛을 치료하며⁷⁾ 약리적으로는 NOS-II, COX-2의 활성화를 억제하고, NO와 PGE₂의 생성을 감소시키는 역할을 한다⁹⁾. 白芍藥은 諸痛을 치료하며⁷⁾ NO, NOS-II를 억제하고¹⁰⁾, 細辛은 TNF- α , IL-8, IL-6 등의 분비를 억제시킨다¹¹⁾, 그 외 甘草¹²⁾, 大棗¹³⁾도 항염증의 약리작용을 가지고 있다고 알려져 있어 MIA로 유도된 골관절염에도 효과가 있을 것이라 예상되었다.

當歸四逆湯과의 효능 비교를 위하여 양성대조군으로 설정되어 투여된 조인스정은 威靈仙, 瓜蒌根, 夏枯草로 구성된 약으로 항염증 작용을 통하여 통증을 완화시키고 만성 염증의 진행을 억제하며 면역 조절 작용의 기능과 관절조직의 허혈성 스트레스를 방지하고 연골 분해를 억제하는 작용으로 현재 관절염 치료제로 널리 쓰이고 있는 약물이다. 하지만 임상시험 연구에서 기존 관절염 치료제와 비교하여 부작용은 적었으나 실험 대상의 17.6%에서 여전히 소화 장애, 심혈관계 이상, 신장이상 등의 약물 관련 부작용이 나타난 것으로 보고되었다²⁵⁾.

이에 저자는 골관절염에 대한 효과와 안전성이 뛰어난 약물 개발을 위하여 본 실험을 진행하였으며, 뒷다리 체중부하 검사, 체중변화, 식이효율, 간 및 신장독성 검사, 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정, 슬관절 조직의 cytokine 유전자 발현 분석과 연골의 병리조직학적 변화를 관찰하여 이를 검증하고자 하였다.

當歸四逆湯의 안전성을 확인하기 위하여 흰쥐의 체중 변화와 식이효율을 측정하였다. 각 군의 체중변화는 모든 군에서 정상군과 비슷하게 완만하고 지속적인 증가 곡선으로 나타났으며, 식이 효율에서도 대조군에 비하여 當歸

四逆湯 투여군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았으므로 當歸四逆湯의 투여는 흰쥐의 몸무게 및 증상에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A, B).

약물의 생체 내 독성을 알아보기 위해 간 기능을 반영하는 AST, ALT와 신장 기능을 반영하는 Creatinine 수치를 알아본 결과 AST는 MIA로 골관절염이 유발된 모든 군에서 정상군 대비 증가된 수치를 보였지만, 대조군과 비교하여 當歸四逆湯 투여군의 유의한 차이는 보이지 않았다. ALT는 대조군에 비하여 當歸四逆湯 투여군에서 유의하게 상승하였지만 ALT의 정상범위였으므로²⁶⁾ 간독성은 없었다(Fig. 2). Creatinine 수치도 대조군에 비하여 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 체중변화, 식이효율, 간 및 신장 기능검사의 결과는 흰쥐에게 투여된 當歸四逆湯이 안전한 약물임을 알 수 있었다(Fig. 3).

골관절염이 유발된 흰쥐는 관절염이 유발된 뒷다리로 체중을 신지 않으려고 하는 특징²⁷⁾ 때문에 MIA 주입 7일 뒤부터 정상 뒷다리와 골관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하 변화가 발생하게 된다. 본 실험에서는 MIA 주사 7일 후에는 대조군에 비하여 유의성 있는 차이가 발생하지 않았으나 14, 21일 후에는 대조군에 비하여 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소가 나타났다. 따라서 當歸四逆湯은 골관절염이 유발된 흰쥐 뒷다리의 통증 억제에 효과가 있었다(Fig. 4).

IL-1 β , IL-6는 골관절염 진행시 증가되는 염증 cytokine으로 골관절염의 진행 상황을 알 수 있다. IL-1 β 는 면역 반응 등에 관여하며, 대식세포, 수지상세포, 섬유아세포 등에서 발현되어 염증, 세포분화, 세포사멸의 반응을 일으키는 cytokine이다²⁸⁻³⁰⁾. IL-6는 급성 조절 단백질로 TNF- α 과 IL-1에 의해 분비가 촉진되며, 파골 세포의 분화를 촉진시켜 골 흡수를 활성화 시키고, 골 생성에도 방해하는 역할을 한다³¹⁾. IL-1 β , IL-6 측정에서 대조군에 비해 DGSYT300과 JoinsT에서 유의하게 감소한 것으로 나타나(Fig. 5A, B) 當歸四逆湯이 염증 인자에 영향을 미쳐 골관절염에 효과있을 것으로 사료된다.

Cytokine 등의 자극에 의해 세포 지질막에서 분비되는 arachidonic acid는 COX와 lipoyxygenase의 활성화에 따라 prostaglandin, leukotriene 등으로 전환되는 불포화 지방산이다³²⁾. 그 중 LTB₄는 염증 반응에서 호중구, 호산구에 대하여 강력한 유주성 특징을 가지며 류마티스 질환, 골관절염, 치주염 등의 염증 유발성 골손실 질환에서

증가되며^{33,34)}, 파골세포에 의한 뼈 흡수를 촉진한다³⁵⁾. LTB₄ 측정에서 DGSYT300과 JoinsT에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내어(Fig. 5C), 파골세포의 활성화를 저해시켜 뼈의 흡수를 방지하는 효능이 있을 것으로 사료된다.

Osteocalcin은 조골세포에 의해 발현되며 칼슘과 결합하는 가장 풍부한 비콜라겐성 골기질 단백질이다³⁶⁾. 이는 뼈에 대하여 두 가지 역할을 하는데, 조골세포와 파골세포를 조절하여 뼈의 재형성을 일으키는 것과, 뼈의 무기화작용의 조절자 역할이다. 특히 뼈 흡수와 관련된 과정에서의 osteocalcin은 골기질에서 파골세포의 분화 마지막 단계에서 파골세포의 성숙에 기여한다^{37,38)}. Osteocalcin 측정에서 대조군에 비해 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소가 나타났다(Fig. 5D). 이는 當歸四逆湯이 osteocalcin의 억제를 통한 파골세포의 성숙을 저해하여 골관절염에서 나타나는 골파괴를 예방할 것으로 사료된다.

TNF- α 는 병변에 인접한 윤활막 세포나 대식세포 등에서 생성되며 골관절염이 발생한 인접한 골 조직에서 조골세포를 저해하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin, thromboxane 등으로 변환시키는 효소단백질로 염증 반응을 조절하는 중요한 역할을 하기 때문에 비스테로이드성 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 통한 COX 발현 억제는 통증 뿐만 아니라 염증도 완화시키는 작용을 한다^{40,41)}. NO는 여러 조직과 세포에서 L-arginine으로부터 Nitric oxide synthase에 의해 생성되어 면역기능, 신경전달, 혈액응고, 혈압조절의 역할을 한다⁴²⁾. NO를 생성하는 NOS 중 NOS-II는 다양한 조직에서 TNF- α , IL-6, lipopolysaccharide 등에 의해 유도되어 다량의 NO를 생성하여 관절 연골 등의 조직에 유해 작용을 나타낸다^{43,44)}.

슬관절 조직 내 cytokine mRNA를 측정한 결과, TNF- α , IL-6 및 COX-2 mRNA 발현량은 대조군에 비해 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소를 나타내었고(Fig. 6A, C, D), IL-1 β 와 NOS-II mRNA 측정에서 DGSYT100 및 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소가 나타났다(Fig. 6B, E). 따라서 當歸四逆湯은 염증 반응에 관여하여 이를 억제시키고 진통작용을 나타내며, 조골세포의 저해를 방지하고 파골세포의 분화를 억제하여 연골 손상을 방지한다고 할 수 있다.

슬관절 내 활막조직, 연골세포, 섬유조직의 병리조직학

적 관찰을 위하여 H&E와 Safranin-O 염색을 실시하였다. 성분의 변화를 관찰하기 위한 단순 염색인 H&E 염색은 Hematoxylin이 호염기성, Eosin은 호산성으로 핵, proteoglycan, 세포질 등을 염색하며 Safranin-O는 양이온성 염색소로서 keratan sulfate나 chondroitin sulfate 등의 음이온과 결합해 연골에 분포하는 proteoglycan의 양에 비례하여 적색 또는 오렌지색으로 염색되기 때문에 연골의 proteoglycan 농도 변화를 계략적으로 추정할 수 있다⁴⁵⁾.

H&E 염색 후 관찰한 결과, 대조군에 비하여 當歸四逆湯 투여군과 JoinsT는 관절 조직의 변형이 심한 대조군에 비하여 활막조직, 연골세포, 섬유조직 모두 비교적 안전하게 보존되어 있는 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 7A), Safranin-O 염색 후 관찰에서도 대조군은 관절조직의 파괴가 일어나 적색이 적었으나 當歸四逆湯 투여군과 JoinsT에서는 연골부위에 적색이 많이 관찰되어 proteoglycan의 농도가 높다는 것을 알 수 있었기 때문에(Fig. 7B), 當歸四逆湯의 투여가 병리조직학적 보호가 양호하게 이루어 졌다고 사료된다.

이상의 실험 결과로 미루어 볼 때, 當歸四逆湯은 MIA로 유발된 흰쥐의 골관절염에 작용하여 염증 cytokine 및 매개인자의 활성화를 억제하는 항염증의 효과와 진통 작용을 가지고 있었으며, 조골 작용의 저해를 방지하고 파골작용을 억제하여 관절의 연골 및 조직의 파괴에 대한 보호 작용이 있으므로 골관절염의 치료제로 이용될 수 있으리라 사료된다.

결론»»»»

當歸四逆湯이 MIA로 유도된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ALT는 대조군에 비해 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 유의하게 증가되었으나 정상범위에 속하였다. AST와 Creatinine도 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다.
2. 뒷다리 체중부하 측정에서 MIA 유발 14, 21일 후 DGSYT300, JoinsT에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다.
3. 혈청 내 cytokine 및 매개인자 측정에서 IL-1 β , IL-6, LTB $_4$ 와 Osteocalcin는 대조군에 비해 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소를 나타냈다.

4. 슬관절 조직 내 cytokine 유전자 발현 측정에서, IL-1 β 및 NOS-II mRNA 발현량은 대조군에 비해 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 유의한 감소를 나타냈으며 TNF- α , IL-6, COX-2 mRNA 발현량은 대조군에 비해 DGSYT300과 JoinsT에서 유의한 감소가 나타났다.

5. 병리조직학적으로 관절에서 대조군에 비해 DGSYT100, DGSYT300, JoinsT에서 활막 조직, 연골 및 proteoglycan 등의 변화가 억제되었다.

이상의 결과로 보아 當歸四逆湯은 MIA로 유도된 흰쥐의 골관절염에서 항염증, 진통효과 및 골관절염 진행에 대해 억제하는 효과가 있다고 사료된다.

References»»»»

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 제6판. 서울:최신키의사. 2006:253-61.
2. 문형표. 2012 국민건강통계. 국민건강영양조사 제5기 3차년도(2012). 서울. 보건복지부 질병관리본부. 2012:678.
3. Ministry for Health and welfare. Elderly real state survey. Seoul. Ministry for Health and Welfare. 2009.
4. 한방재활의학회. 한방재활의학. 서울:군자출판사. 2012:97-8.
5. 張仲景. 仲景全書. 서울:대성문화사. 1993:286-7.
6. 국윤범 등. 방제학. 서울:영림사. 2008:253-5.
7. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 제2판. 서울:영림사. 2007:154-5, 629-31, 634-5.
8. 최상원, 김은옥, 임현희, 김진경. 천궁 및 당귀 휘발성 향기추출물의 항염증 효과. 한국식품영양과학회지. 2012;41(8):1057-65.
9. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수영, 심범상, 이재현, 임사비나. 계지의 항염 효과에 관한 연구. 2005;26(2):141-51.
10. Chen G, Tan ML, Gao X, Kong SZ. Total Glucosides of Paeonia lactiflora Pall Suppress Nitric Oxide Production and iNOS Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264,7 Macrophages. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014;13(8):1273-8.
11. Kim KS, Kim NS, Kim SD, Kil YY, Yeom SR. Regulatory effect of inflammatory reaction by Asiasari radix. Korean J. oriental physiology & pathology 2005;19(3):779-84.
12. 한영주, 박양춘. 감초가 천식모델 생쥐의 BALF 내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):408-17.
13. 전영희. 대추 추출물의 아토피관련 사이토카인, 히알루로니다제 및 항산화 활성에 미치는 영향. 서울여자대학교 대학원 석사학위논문. 2010.
14. 이승인. 新古方撰次. 서울:군자출판사. 2012:343.

15. 윤종현. 골관절염의 최신지견. *대한내과학회지*. 2012;82(2):170-4.
16. 장효길, 허동석. 麻黃附子湯이 Papain으로 유도된 골관절염 생쥐 모델에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*. 2012;22(4):59-77.
17. 국길호, 오민석. 理中湯이 골관절염 유발 생쥐에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*. 2014;24(1):31-45.
18. 이형은, 오민석. 麻黃附子細辛湯이 MIA로 유도된 골관절염 유발 Rat에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*. 2014;24(2):65-81.
19. 이은정, 오민석. 健步丹이 MIA로 유도된 골관절염 Rat에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*. 2014;24(2):51-64.
20. 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.
21. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*. 2004;112(1-2):83-93.
22. Dumond H, Presle N, Pottier P, Pacquelet S, Terlain B, Netter P, Gepstein A, Livne E, Jouzeau JY. Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(4):284-95.
23. 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. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(8):751-60.
24. Schuelert N, McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett*. 2009;465(2):184-8.
25. Cho YB. Development of a New Herbal Anti-Arthritis Drug, Joins™ (SKI 306X). *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EAST-WEST MEDICINE*. 2001;1:255-69.
26. 권영일, 강세찬, 강진석, 권중균, 박우대. *실험동물 임상병리학*. 서울:아카데미아. 2009;42, 185.
27. 이용수. Monosodium iodoacetate(MIA)로 유발된 관절염 흰쥐의 행동학적 조직학적 변화. *고려대학교 대학원*. 2008:1-13.
28. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, Gravalles E, Mathis D, Benoist C. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor- α in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 2002;196(1):77-85.
29. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:282-90.
30. Zwerina J1, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen JS, van den Berg W, Schett G. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(28):11742-7.
31. 방선정, 김일신, 김옥수, 김영준, 정현주. 한국인 전반적 급진성 치주염 환자에서 IL-6 유전자 다변성에 관한 연구. *대한치주과학회지*. 2008;38(4):579-88.
32. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*. 2008;14(10):461-9.
33. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385(2):231-41.
34. Chen M, Lam BK, Luster AD, Zarini S, Murphy RC, Bair AM, Soberman RJ, Lee DM. Joint tissues amplify inflammation and alter their invasive behavior via leukotriene B4 in experimental inflammatory arthritis. *J Immunol*. 2010;185(9):5503-11.
35. Garcia C1, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 1996;11(11):1619-27.
36. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev*. 1996;54:332-3.
37. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol*. 2013;228:1149-53.
38. Ishida M, Amano S. Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab*. 2004;22(5):415-29.
39. Nanes MS. Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*. 2003;321:1-15.
40. Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, Fikrig E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(3):187-91.
41. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*. 2008;14(10):461-9.
42. Garthwaite J. New insight into the functioning of nitric oxidereceptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem, Mol Cell Biochem*. 2010;334(1-2):221-32.
43. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(2):522-6.
44. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994;269(19):13725-8.
45. 이수호, 권기대, 이상원, 조수현, 안형선. 대퇴골두 골괴사에서 비구 연골의 변성. *대한정형외과학회지*. 2004;39(3):239-46.