

대영전의 Monosodium Iodoacetate 유발 관절연골손상 억제 효과

서일복 · 정수현* · 박동수*

세명대학교 한의과대학 해부학교실, 한방재활의학과교실*

Inhibitory Effects of *Daeyeoungjeon* on the Injury of Articular Cartilage Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats

Il-Bok Seo, D.V.M., Su-Hyeon Jeong, K.M.D.*, Dong-Su Park, K.M.D.*

Departments of Anatomy and Rehabilitation Medicine of Korean Medicine*, College of Korean Medicine, Semyung University

이 논문은 2015학년도 세명대학교
교내학술연구비 지원에 의해서
수행되었음.

RECEIVED March 22, 2017
REVISED April 9, 2017
ACCEPTED April 10, 2017

CORRESPONDING TO
Dong-Su Park, Department of
Rehabilitation Medicine of Korean
Medicine, College of Korean
Medicine, Semyung University, 65
Semyung-ro, Jecheon 27136, Korea

TEL (043) 649-1821
FAX (043) 649-1382
E-mail aquanablue@naver.com

Copyright © 2017 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was aimed to evaluate the effects of *Daeyeoungjeon* (hereinafter referred to DYJ) treatment on the injury of articular cartilage induced by monosodium iodoacetate in rats.

Methods Twenty-four male rats were divided into normal, osteoarthritic control and DYJ group. Rats of normal group were injected with 0.1 ml physiological saline, rats of control and DYJ groups were injected with 0.1 ml monosodium iodoacetate (3 mg/ml) into each left and right knee joint cavities. Rats of DYJ group were administrated extracts of DYJ during 60 days per orally. At 60 days after treatment, gross lesions, area and proteoglycan contents of articular cartilage, histopathological lesions, immunohistochemistry on matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, MMP-7) were evaluated.

Results Grossly, degenerative changes of articular cartilages were observed weak in DYJ group. The areas of articular cartilages were broader significantly in DYJ group. The proteoglycan contents in articular cartilages were lesser significantly in DYJ group. Histopathologically, the chondrocyte score was lesser significantly in DYJ group. MMP-3 expression in articular cartilages was observed weak in DYJ group.

Conclusions From above results, DYJ treatment has inhibitory effects on the injuries of articular cartilage induced by monosodium iodoacetate in rats, and its effects may be related with down regulation of MMP-3. (**J Korean Med Rehabil 2017;27(2):9-17**)

Key words *Daeyeoungjeon* (DYJ), Osteoarthritis, Proteoglycan, Matrix metalloproteinase-3

서론»»»»

골관절염(osteoarthritis)은 관절연골의 변성으로 시작되어 점진적으로 관절연골 및 연골하 골조직을 파괴하며 통증 및 강직증을 초래하는 만성 퇴행성 질환이다¹⁾. 2013 국민건강통계²⁾에 의하면 방사선학적 골관절염 유병율은 50대의 연령에서 19%, 60대의 연령에서 40%, 70세 이상

의 연령에서 61%로 조사되어, 골관절염은 근골격계를 침범하는 가장 흔한 질병으로 알려져 있다.

한의학적으로 골관절염은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎 혹은 精氣虛弱을 틈타 경락으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣은행을 저해하는 痺證의 범주에 속하며 치료는 상황에 따라 한약, 봉독, 약침, 침, 뜸 및 태극권 등의 치료 방법이 활용되고 있다³⁾.

대영전은 『景岳全書』⁴⁾에서 처음 소개된 처방으로 “治眞陰精血虧損 及婦人經遲血少 腰膝筋骨疼痛 或氣血虛寒 心腹疼痛等證”이라고 수록되어 있으며 益命門, 補精血, 養肝腎, 壯筋骨의 효능으로 여성의 월경부조, 갱년기증상, 내분비 실조, 각종 관절염 등에 활용되어 왔다⁵⁾.

대영전을 이용한 연구로는 골다공증⁶⁾, 인체경락기능과 활성산소⁶⁾, 갑상선기능저하증⁷⁾, 배란과 난소에 미치는 영향⁸⁾에 관한 연구 등이 있었고 골관절염에 관한 보고는 아직 접하지 못하였다.

골관절염의 질환모델로서 monosodium iodoacetate (MIA) 모델은 비교적 단기간에 병변이 유발되고, 용량의 존성으로 병변을 유발시킬 수 있으며, 사람의 골관절염과 유사한 점이 많아⁹⁾ 한의학적 치료의 효능평가에 널리 이용되고 있다. 특히 2014년 이후 시행된 한약제제와 관련된 국내 골관절염연구에서는 대부분 MIA 모델을 사용하고 있다¹⁰⁻¹⁷⁾. 또한 최근의 연구에서 MIA 단회 투여는 60일간의 기간 동안 관절연골의 손상을 지속시킴이 확인되어 만성 골관절염에 대한 장기 약효 실험에 매우 적합한 모델로 평가되고 있다¹⁸⁾.

이에 저자는 본 연구에서는 대영전의 장기투여로 인한 효과를 확인하고자 MIA 관절염 모델을 이용하여 대영전의 투여에 따른 관절연골의 육안적 소견, 병리조직학적 소견, 관절연골 면적, 연골내 proteoglycan (PG) 함유율 및 matrix metalloproteinases 발현의 차이를 관찰하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(나라 바이오텍, 한국)를 구입하여 세명대학교 동물사육실(온도 23°C, 습도 55%, 12시간 주기 명암)에서 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 전 실험기간 동안 사료 및 음수는 충분히 제공하였다. 본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: smecae 140602) 하에 실시되었다.

2. 대영전 농축액의 제조

실험에 사용한 대영전(Daeyeoungjeon, DYJ)은 『景岳全書』⁴⁾에 의거하여 처방하였으며, 각 구성 약재는 세명대학교부속한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였으며, 처방 내용과 1첩 분량은 Table I과 같다.

대영전 4첩 분량 54 g을 2,000 ml의 증류수에 2시간 동안 담가둔 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 10분간 6,000 g로 원심하여 부유물을 침전시키고 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 100 ml로 농축시켜 실험에 사용하였다.

3. 실험군의 설정

총 24마리의 흰쥐를 정상군(Normal), 대조군(Control) 및 대영전군(DYJ)에 각각 8마리씩을 배정하였다.

정상군에는 실험개시일에 양측 슬관절강내에 각 각 멸균 생리식염수 0.1 ml씩을 1회 주사하고 60일간 1일 1회 증류수 1 ml을 경구투여하였다.

대조군에는 Januzs 등¹⁹⁾의 방법을 변형하여 실험개시일에 양측 슬관절강내에 각각 3 mg/ml 농도의 monosodium iodoacetate (MIA) (Sigma, USA) 용액 0.1 ml씩을 1회 주사하여 골관절염을 유발시키고 60일간 1일 1회 증류수 1 ml을 경구투여하였다.

대영전군에는 대조군과 같이 MIA 용액을 주사하고 60일간 1일 1회 대영전 농축액 1 ml을 경구투여하였다.

Table I. Prescription of Daeyeoungjeon (DYJ) Per Pack

Name of herbs	Pharmacognostic name	Weight (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	12
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	8
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	8
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	8
杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	8
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	6
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4
Total		54

4. 검사 항목 및 방법

1) 체중의 측정

실험개시일, 20일, 40일, 60일에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

2) 표본의 처리

실험 60일에 각 군의 모든 개체를 경추탈골법으로 희생시킨 후 우측 및 좌측 슬관절 부위를 적출하고 10% 중성포르마린액에 담가 24시간 고정하였다. 고정된 우측 슬관절에서 경골을 분리하여 육안관찰 및 safranin O 염색에 사용하였으며, 좌측 슬관절은 병리조직학적 검사에 사용하였다.

3) 관절연골의 육안 관찰

고정된 우측 경골 근위단의 관절연골 주변을 깨끗이 정리하고 사진 촬영하여 육안적으로 관절연골표면의 상태를 관찰하였다.

4) 관절연골의 면적 및 proteoglycan (PG) 함유율 평가

육안관찰에 사용된 경골 근위단을 40% formic acid액과 20% sodium citrate액을 동량으로 섞은 탈회액에 담가 4일간 교반 시키면서 탈회시켰다. 탈회된 경골 근위단의 정중 관상단면을 만들고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 μ m 두께의 박절편을 제작하였다.

경골 근위단 관절연골내의 PG 변성을 확인하기 위하여 박절편된 표본을 Safranin O 염색 및 Hematoxylin 대조염색을 실시하였다. 저배율의 시야에서 관절연골이 모두 보이도록 조직사진을 촬영한 후 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 내측 및 외측 관절연골의 면적과 관절연골에서의 투과도를 측정하였다. 정상군에서 측정된 관절연골의 면적 및 투과도의 평균을 100%로 설정하고, 대조군 및 대영전군

에서의 면적 및 투과도를 환산하여 관절연골의 면적 및 PG 함유율로 평가하였다.

5) 병리조직학적 관찰 및 골관절염 지수의 평가

좌측 슬관절을 탈회액에 담가 4일간 교반 시키면서 탈회시켰다. 대퇴골 및 경골의 관절면과 슬관절낭이 포함되도록 슬관절 시상단면을 만들고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 5 μ m 두께의 슬관절 박절편을 제작하였다.

슬관절 박절편을 Hematoxylin & Eosin 염색하고 광학현미경으로 슬관절의 병리조직학적 변화를 관찰하였으며, 관절연골 및 연골하 골조직에서 관찰된 병리조직학적 병변을 Rudolphi 등²⁰⁾의 방법에 준하여 골관절염 지수를 평가하였다(Table II).

6) Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3 및 MMP-7 면역조직화학염색

PG 함유율을 평가하기 위해 제작된 경골 근위단 박절편을 poly-L-lysine 처리한 슬라이드에 조직절편을 부착하고 0.3% H₂O₂ 용액에 30분간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit (Vector Lab., USA)를 이용하여 MMP-2, MMP-3 및 MMP-7에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다.

비특이 반응을 억제하기 위해서 조직절편을 정상 혈청으로 30분간 반응시킨 후 가볍게 세척하고 일차 항체를 도포하여 4°C에서 24시간 반응시켰다.

일차항체로는 mouse monoclonal anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), mouse monoclonal anti-human-MMP-3 (Chemicon International Inc., USA) 및 mouse monoclonal anti-MMP-7 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)을 각각 1:500으로 희석하여 사용하였다.

일차 항체 반응 후 biotin이 부착된 anti-mouse IgG (Vector Lab., USA)를 상온에서 30분간 반응시키고, ABC

Table II. Criteria for Histopathological Scores of Osteoarthritic Lesions

Matrix score	Chondrocyte score	Subchondral bone score
0 Normal	0 Normal	0 Normal
1 Surface irregularities	2 Reduced cells	3 Remodeling processes
3 Superficial fibrillation	5 Strongly reduced cells	8 Thickening, strong sclerosis
6 Clefts in deep zone	8 Total loss of cartilage and cells	
8 Massive loss of cartilage		

reagent (Vector Lab., USA)를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05 M PBS buffer (pH 7.5)로 5분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB (Roche, Germany)로 10분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 MMPs의 발현정도를 관찰하였다.

5. 통계처리

정상군과 대조군, 대조군과 대영전군에서 측정된 평균 값 차이에 대한 유의성은 SPSS (SPSS 12.0 for Windows, USA) 프로그램을 이용하여 student's t-test로 검증하였다. 모든 측정치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결과»»»»

1. 체중의 차이

정상군의 체중은 실험개시일부터 실험종료일까지 꾸준히 증가되어 60일간의 체중증가율은 78.6%에 달하였다. 대조군의 체중은 실험 20 및 40일에 각각의 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 실험 60일의 체중 및 60일간의 체중증가율은 정상군에 비해서 낮았으나 유의성은 없었다. 대영전군은 대조군과 유사한 정도의 체중 및 체중증가율을 보였다(Table III).

2. 관절연골의 육안 소견

정상군의 슬관절을 구성하는 경골 근위단의 관절연골

표면은 매끄럽고 윤택감이 있게 관찰되었다. 대조군의 모든 예에서는 관절연골 표면의 윤택감이 사라져 거칠게 보였으며, 연골 표면의 부분적 탈락도 관찰되었다. 대영전군에서도 연골 표면이 거칠게 보이고 변색되어 있었으나, 그 정도는 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 1).

3. 관절연골 면적 및 Proteoglycan (PG) 함유율의 차이

경골 근위단을 safranin O 염색한 결과, 정상군은 연골

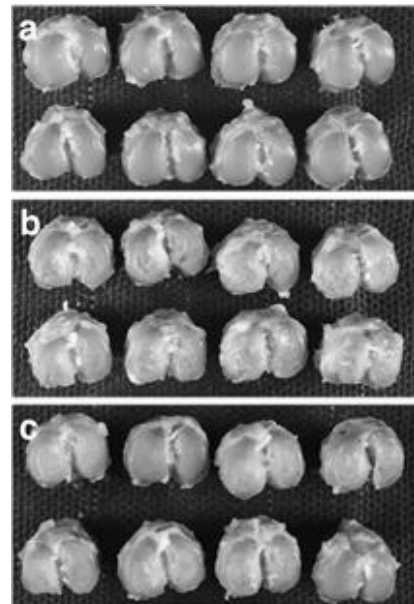


Fig. 1. Photograph of proximal tibial condyle. The articular surfaces of proximal tibia of normal group (a) are smooth and glossy. The surfaces of arthritic control group (b) are discolored, coarse and ulcerated. The surfaces of DYJ group (c) are discolored and coarse, but compared with the control group, the degree of lesions is weak.

Table III. The Changes of Body Weight

Group	Body weight (g)				Increased ratio (%)
	0	20	40	60 days	
Normal	231±9	330±14	385±15	412±15	78.6±9.4
Control	232±8	307±16*	364±14*	399±13	72.3±10.3
DYJ	232±7	306±17	362±13	396±16	70.8±7.3

Normal: a single intra-articular saline injected normal group. Control: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected osteoarthritic group. DYJ: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected and treated with DYJ.

Statistically significant compared with normal group ($p < 0.05$).

층 전체가 진하고 고르게 염색되었으며, 대조군은 연골층의 탈락 및 연골층의 변성으로 염색된 면적 및 염색 강도가 현저히 감소되어 있었다. 대영전군에서는 비교적 연골층이 유지되어 있었으며, 염색강도도 대조군에 비해서 진하게 확인되었다(Fig. 2).

칼라영상분석기로 관절연골의 면적 관절연골내 PG 함유율을 측정된 결과, 대조군은 연골면적 및 PG 함유율이 각각 정상군에 비해서 각각 유의하게 감소되었다. 대영전군은 연골면적 및 PG 함유율이 각각 대조군에 비해서 유의하게 증가되었다(Table IV).

4. 슬관절의 병리조직학적 소견 및 골관절염 지수의 차이

생리식염수만을 슬관절강내에 주입한 정상군의 슬관절에서는 정상범위의 소견만이 관찰되었다(Fig. 3A). MIA를 슬관절강내에 주입한 대조군에서는 관절연골의 변성과 연골의 탈락 및 연골하골조직의 반응성 재구축이 주된 병변으로 관찰되었다(Fig. 3B, C). 대영전군의 병리조직학적 병변은 대조군과 유사하였으나 연골의 변성 및 연골하골조직의 반응성 재구축소견은 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 3D).

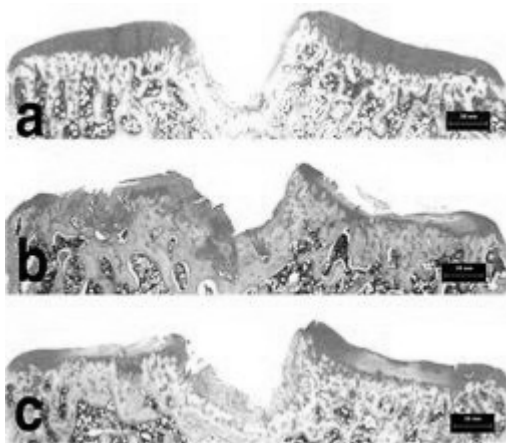


Fig. 2. Microphotograph of proximal tibial condyle stained with Safranin O. The stain intensity of articular cartilages of normal tibia (a) are strong. The area and stain intensity of articular cartilages of osteoarthritic control tibia (b) are decreased. The area and stain intensity of articular cartilages of DYJ-treated tibia (c) are increased compared with control tibia. Safranin O stain, bar=0,5 mm.

병리조직학적인 대조군의 골관절염 지수는 기질점수(matrix score), 연골세포점수(chondrocyte score) 및 연골하골점수(subchondral bone score) 항목에서 모두 3.5 이상으로 평가되었다. 대영전군의 연골세포점수는 대조군에 비해서 유의하게 낮게 나타났으며, 기질점수, 연골하골점수 및 총관절염지수 모두 대조군에 비해서 낮았으나 유의성은 없었다(Table V).

Table IV. The Changes of Area and Proteoglycan Contents of Tibial Articular Cartilages

Group	Area of articular cartilages (%)	Proteoglycan contents (%)
Normal	100.0±6,8	100.0±8,6
Control	36,8±4,1***	44,3±6,9***
DYJ	46,5±7,5**	61,2±13,7 [#]

Normal: a single intra-articular saline injected normal group. Control: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected osteoarthritic group. DYJ: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected and treated with DYJ.

*Statistically significant compared with normal group (**p<0,001).

[#]Statistically significant compared with control group ([#]p<0,05, **p<0,01).

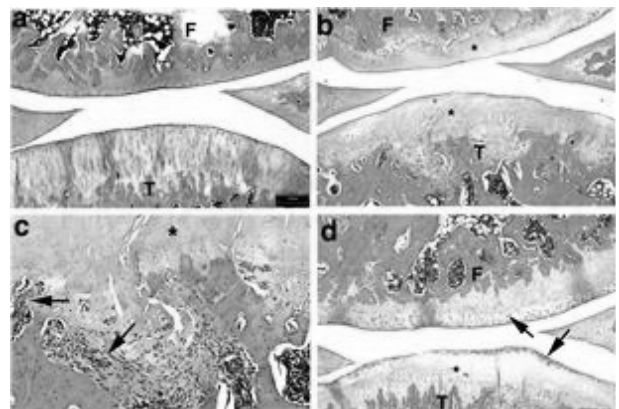


Fig. 3. Microphotograph of knee joint. In normal knee joint(a), articular cartilages of tibia (T), femur (F) and patella are well developed. In control knee joint(b), articular cartilages (*) of tibia (T) and femur are degenerated, and appeared homogeneously. Higher magnification of b (c), degeneration of articular cartilage (*) and remodelling processes (arrows) at subchondral bony tissue are observed. In DYJ treated knee joint (d), articular cartilages (*) are degenerated, but many of chondrocytes (arrows) are remained. H&E stain, bar=200 μm.

Table V. The Changes of Osteoarthritic Score of the Knee Joints

Group	Matrix score	Chondrocyte score	Subchondral bone score	Sum of scores
Normal	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Control	4.5±1.6***	5.4±1.1***	3.6±1.8***	14.0±3.1***
DYJ	4.1±1.6	3.9±1.6 [#]	1.9±1.6	9.9±3.9

Normal: a single intra-articular saline injected normal group. Control: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected osteoarthritic group. DYJ: a single intra-articular monosodium-iodoacetate injected and treated with DYJ.

*Statistically significant compared with normal group (***p<0.001). [#]Statistically significant compared with control group ([#]p<0.05).

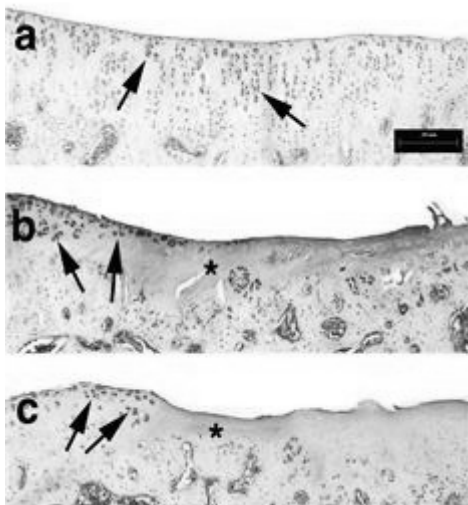


Fig. 4. Microphotograph of proximal tibial condyle immunohistochemical stained with MMP-3. In normal tibia (a), MMP-3 were expressed weakly in chondrocytes but not in matrix. In osteoarthritic control tibia (b), MMP-3 were expressed strongly in chondrocytes (arrows) and degenerated matrix (*). In DYJ-treated tibia (c), MMP-3 were expressed moderately in chondrocytes (arrows) and degenerated matrix (*).

MMP-3 immunohistochemistry, bar=200 μm.

5. Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3, MMP-7 발현의 차이

MMP-2는 정상군의 연골세포 및 연골기질 모두에서 발현되지 않았다. 대조군에서는 반응성으로 증식된 연골세포 및 변성된 연골기질에서 미약하게 발현되었으며, 대영전군에서의 발현정도는 대조군과 유사하게 관찰되었다.

MMP-3는 정상군의 연골세포에서 미약하게 발현되었으며 연골기질에서는 발현되지 않았다(Fig. 4A). 대조군에서는 변성된 연골기질에서 균질하고 강하게 발현되었으며, 반응성으로 증식된 연골세포에서도 강하게 발현되었다(Fig. 4B). 대영전군에서도 변성된 연골기질 및 증식된

연골세포에서 발현되었으나 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 4C).

MMP-7는 정상군의 연골세포에서 미약하게 발현되었으며 및 연골기질에서는 발현되지 않았다. 대조군에서는 변성된 연골기질 및 반응성으로 증식된 연골세포에서 중정도로 발현되었으며, 대영전군에서의 발현 정도는 대조군과 유사하게 관찰되었다.

고찰»»»»

골관절염은 관절을 보호하는 연골의 손상과 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형을 특징으로 관절통, 경직, 잠김감, 부종 등의 증상을 동반한다³⁾. 골관절염의 진행은 연골세포의 변화와 사멸로 인해 Type II collagen, proteoglycan, aggrecan 등의 세포외기질 생산이 감소하고 세포외기질 분해효소에 의한 세포외기질의 분해가 촉진되면서 연골의 구조가 파괴되어 관절부하를 견디지 못하게 되면서 발생한다. 이러한 연골파괴 과정에서 interleukin (IL)-1β, tumor necrosis factor (TNF)-α, hypoxia-inducible factor (HIF)-2α, transforming growth factor (TGF)-β 등의 사이토카인이 연골을 파괴하는 주요한 효소로 작용한다²¹⁾.

본 연구에서 사용된 대영전은 『景岳全書』⁴⁾에서 소개된 처방으로 熟地黄, 當歸, 枸杞子, 炙甘草, 杜冲, 牛膝, 肉桂로 이루어져 益命門, 補精血, 養肝腎, 壯筋骨의 효능이 있어 골관절염에도 효과가 있으리라고 생각되나 아직까지 연구된 바는 없었다. 그리고 MIA 골관절염 모델을 이용한 한의학연구가 대부분 5주 이하의 단기간 연구였으나 최근의 연구에서 MIA 단회 투여는 60일간의 장기간 동안 관절연골의 손상을 지속시킴이 확인되어¹⁸⁾ 만성질환인 골

관절염에 대한 효능의 평가도 장기간에 걸쳐서 진행하는 것이 적합하다고 사료되고, 대영전의 益命門, 補精血, 養肝腎, 壯筋骨 효능의 평가에도 부합하다고 생각되었다.

이에 본 연구에서는 monosodium iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염모델에 대영전 추출액을 60일간 장기 투여한 후 관절연골의 육안상태, 관절연골의 면적, 관절연골내 proteoglycan 함유율, 슬관절의 병리조직학적 변화 및 연골내 matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3, MMP-7의 발현정도를 비교하여 대영전이 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

본 연구에서 골관절염군의 체중은 골관절염이 유발되는 초기부터 실험 40일까지 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 실험 60일에는 정상군에 비해서 다소 낮았으나 유의성이 나타나지는 않았다. 실험군과 대조군의 차이는 유의성이 없이 유사하였다. 이는 골관절염군에서 발생한 관절연골 손상과 연관된 급성반응으로 인한 식욕결핍 등이 원인이라 생각되며, 골관절염 유발 40일 이후에는 급성반응이 미약해지는 것으로 사료된다.

관절연골의 육안적인 관찰에서는 대조군에서 관절연골의 윤택감이 사라져 거칠어졌고, 연골 표면의 부분적인 탈락이 관찰되었고, 실험군에서는 거친 정도가 대조군에 비해서는 미약하게 관찰되었다. 관절의 병리조직학적 소견에서는 대조군에서 관절연골의 변성과 연골의 탈락 및 연골하골조직의 반응성 재구축이 관찰되었으며 실험군에서는 상대적으로 미약하게 관찰되었다. 골관절염 지수에 있어서는 실험군이 대조군에 비해 연골세포점수가 유의하게 낮았고, 기질점수, 연골하점수, 총관절염지수에 있어서는 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다. 육안적인 관찰과 병리조직학적인 결과로 보아 대영전의 투여가 관절연골의 손상을 억제했을 것으로 사료된다.

정상적인 관절연골에서 PG와 collagen은 관절연골의 세포외기질을 이루는 주성분이며 정상적인 연골세포에 의해서 지속적으로 생산되고, 동시에 연골세포에서 분비하는 수종의 단백분해효소에 의해서 파괴가 진행되어 균형을 이루게 된다²²⁾. PG 함량의 감소는 관절연골의 대사 작용을 저하시키고, 관절연골의 불안정성을 높여 골관절염의 시발점이 된다고 알려져 있다²³⁾.

본 연구에서 관절연골내 PG 함유율을 측정된 결과 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 높았다. 이 결과로 보아 대영전의 투여가 관절연골 내 PG의 파괴를 억제하여

골관절염의 진행을 억제한다고 생각된다.

MMP는 정상적인 환경에서는 세포외기질의 조절된 분해를 담당하는 단백분해효소군으로 과도하게 표현되는 경우에는 세포외기질성분을 광범위하게 분해하여 조직의 손상을 초래한다²⁴⁾. MMP는 주로 조직의 형태발생, 혈관형성, 조직복구, 간경변, 관절염 등에서 다양한 생리, 병리현상에 관여하는데²⁵⁾ 골관절연골에서 MMP-2²⁶⁾, MMP-3²⁷⁾, MMP-7²⁸⁾의 과도한 발현은 관절연골의 손상에서 관찰되는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 MMP-2, MMP-3, MMP-7 발현의 차이를 분석한 결과 MMP-2과 MMP-7은 대조군과 실험군이 유사하게 발현되었으며, MMP-3는 대조군에서 연골기질과 연골세포에서 강하게 발현되었으며 실험군에서는 대조군에 비해 미약하게 관찰되었다. 이 결과로 보아 본 연구의 골관절염군에서는 MMP-3의 발현이 MMP-2, MMP-7에 비해서는 강하게 발현되었고, 대영전군이 MMP-3의 과도한 발현을 억제하여 관절의 파괴를 억제한 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 MIA로 유발된 흰쥐의 골관절염 모델에서 대영전의 투여가 MMP-3의 발현과 PG의 손상을 억제효과를 확인할 수 있었으며 육안적인 소견과 병리조직학적인 소견 중 연골세포점수의 감소를 보였다. 병리조직학적 소견 중 기질점수, 연골하골점수, 총관절염지수의 유의성 있는 감소가 없었고, MMP-2와 MMP-7의 감소는 나타나지 않았으나 전체적인 결과로 보아 대영전이 골관절염의 치료에 활용될 수 있는 계기가 될 것으로 기대한다. 그리고 본 연구는 개체수가 적은 동물 실험인 점에 한계가 있었고, 대영전의 골관절염 치료에 대한 효과 및 필요성에 대한 추가적인 실험 및 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론»»»»

대영전이 골관절염에 미치는 효과를 확인하기 위해서 monosodium iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염모델을 이용하여 대영전 추출액을 60일간 장기투여한 후 관절연골의 육안상태, 관절연골의 면적, 관절연골내 proteoglycan 함유율, 슬관절의 병리조직학적 변화 및 연골내 matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3, MMP-7의 발현정도를 비교하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

- 육안적으로 관절연골 표면의 변색 및 탈락은 대영전의 투여로 완화되어 있었다.
- 관절연골의 면적(%)은 대영전군(46.5±7.5)이 대조군(36.8±4.1)에 비해서 유의성 있게 넓었다.
- 관절연골내 proteoglycan 함유율(%)은 대영전군(61.2±13.7)이 대조군(44.3±6.9)에 비해서 유의성 있게 높았다.
- 병리조직학적으로 연골세포점수는 대영전군(3.9±1.6)이 대조군(5.4±1.1)에 비해서 유의성 있게 낮았다.
- MMP-3의 발현정도는 대영전군이 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다.

이상의 성적을 토대로 할 때, 대영전의 장기투여는 MIA 유발 골관절염모델에서 MMP-3 활성감소와 관련하여 관절연골 손상을 억제하는 것으로 평가된다.

References»»»»»

1. Rosenberg AE. Bones, Joints, and Soft-Tissue Tumors. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, eds. Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2010:1235-6.
2. Ministry of health, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2013: Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Ministry of health Division of Health Policy. 2013:678-80.
3. Rehabilitation Medicine of Korean Medicine. Korean Rehabilitation Medicine. 4th edition. Seoul: Kunja Publishing INC, 2015:102-16.
4. Zhang Jie-bin, Jingyuequashu. Seoul: Jungdam, 1999:1070.
5. Kim KW, Kim SC, Seo BI, Kim SH. A study on the effects of Daeyungjeon on ovariectomized osteoporosis of rats. The Korea Journal of Herbology. 1998;13(1):59-81.
6. Cho KY, Yoo DY. Study on the effect of Yukmijihwangwon and Taeyoungjeon extract on the Meridian of Human body and Active oxygen. Journal of Korea CHUNA manual medicine. 2000;1(1):91-102.
7. Kim DH, Choi JS, Kim CJ, Cho CS. The effects of Daeyungjeon on the hypothyroidism in rats. The Korea Journal of Herbology. 2007;22(4):35-43.
8. Lee SJ, Ko JM, Cjoe CM, Cho HB. Effects of Daeyungjeon on the ovulation and ovary in rats. The journal of Korean obstetrics & gynecology. 2005;18(4): 106-18.
9. Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Cillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis-A dose response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. Arthritis Rheum. 1997;40:1670-9.
10. Lee JH, Woo CH, Kim YJ, Ahn HD. Effect of Seungseup-tang on MIA-induced Osteoarthritis Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2016;26(3): 1-15.
11. Woo CH, Oh MS. Effects of Bujasasim-tang Ethanol Extract on Oxidative Stress, Inflammation and Osteoarthritic Rat Model. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2015;25(2):15-35.
12. Won JH, Woo CH. Effects of Gyejigabuja-tang on MIA-induced Osteoarthritis in Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2015;25(2):51-64.
13. Yang DH, Woo CH, Kim JM, An HD. Effects of Danggwisayeok-tang on MIA-induced Osteoarthritis Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2015;25(2): 37-50.
14. Lee EJ, Oh MS. Effects of Keonbodan on MIA-induced Osteoarthritis in Rat. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2014;24(2):51-64.
15. Kook KH, Oh MS. Effects of Leejung-tang on MIA-induced Osteoarthritis Rat. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2014;24(1):31-45.
16. Kim DH, Kang SI, Song MY, Choi JB, Bae KJ, Han JS, Yang MS, Sin YJ. Effects of Bangkeehwangkee-tang Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2014;24(2):15-29.
17. Lee HE, Oh MS. Effects of Mahwangbujaseshin-tang on MIA-induced Osteoarthritis Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2014;24(2):65-81.
18. Seo IB, Park DS. Osteoarthritis medel induced by Monosodium iodoacetate: Good model for long-term drug eddicacy test. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2015;25(4):21-8.
19. 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 and Cartilage, 2001;9:751-60.
20. Rudolphi K, Gerwin N, Verzijl N, van der Kraan P, van den Berg W. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2003;11(10):738-46.
21. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, et al. 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.

22. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(8): 924-9.
23. Shinomura T. Proteoglycan knock-out mice and osteoarthritis. *Clin Calcium.* 2004;14(7):58-63.
24. Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2001;8(4):425-74.
25. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005;38(1):73-83.
26. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):14811-22.
27. Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, van den Berg WB. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum.* 2007;56(1):147-57.
28. Tao Y, Qiu X, Xu C, Sun B, Shi C. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-7 and interleukin-15 in human osteoarthritis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8): 9112-8.