



Original Article / 원저

大羌活湯이 흰쥐에서 MIA로 유발된 골관절염에 미치는 항염증 및 연골 보호 효과

김주란, 이정희, 이윤규, 이현종, 김재수*

대구한의대학교 한의과대학 침구학교실

Anti-inflammatory and Cartilage Protection Effects of *Daeganghwal-tang* in MIA-induced Osteoarthritis at Rats

Ju-ran Kim, Jung Hee Lee, Yun Kyu Lee, Hyun-Jong Lee, Jae Soo Kim*

Department of Acupuncture & Moxibustion medicine, College of Korean medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to evaluate the effects of *Daeganghwal-tang* on knee cartilage in monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritis rats.

Methods : Forty SD rats were randomly divided into five groups(n=8/group): normal group was SD rats group injected with normal saline at left knee joint and administrated orally distilled water, control group was MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally distilled water, Indomethacin group was MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally indomethacin 2 mg/kg, DGHT(L) group was MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 1280 mg/kg of *Daeganghwal-tang*, and DGHT(H) group was MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 2560 mg/kg of *Daeganghwal-tang*. After orally administration of drugs for 4 weeks, gross appearance and histological analysis were used to evaluate the degree of knee cartilage damage. In addition, pro-inflammatory cytokines, bone degrade factor and bone defence factors were analyzed to investigate the anti-inflammatory and cartilage protection effects of *Daeganghwal-tang*. Also, hematological test, biochemical test, and liver and kidney tissue were analyzed to determine the safety of *Daeganghwal-tang*.

Results : *Daeganghwal-tang* inhibited the damage of the knee cartilage, and significantly prevented the reduction in cartilage thickness. In addition, the pro-inflammatory cytokines and the bone degrade factor significantly decreased, and the bone defence factors significantly increased. In the safety assessment of *Daeganghwal-tang*, there were no significant differences among the experimental groups and no abnormal findings were observed.

Conclusions : *Daeganghwal-tang* has anti-inflammatory effect, inhibits cartilage damage, and protects cartilage in MIA-induced osteoarthritis rats.

Key words : *Daeganghwal-tang*, MIA, Osteoarthritis, Anti-inflammatory effect, Cartilage protection effect.

I. 서론

골관절염(osteoarthritis)은 중년 또는 노년에 흔히 발생하는 관절 질환으로¹⁾, 연골 및 연골하부의 국소적인 퇴행성 변화뿐만 아니라 활액막 등 주변의 연부조직에도 조직학적 변화를 일으키는 질환이다²⁾. 지난 수십 년간 고령화와 비만인구의 증가에 따라 골관절염의 유병률이 유의하게 증가하고 있으며, 무증상인 경우도 많기 때문에 이를 포함할 경우 전 세계적으로 대략 2억 5천만 명의 인구가 골관절염에 이환 중인 것으로 추정된다^{3,4)}. 그로 인해 사회경제적 부담이 증가하고 있으며, 질병을 안고 생활하는 기간을 나타내는 수치인 장애생활연수(years lived with disability, YLD)의 주된 원인 중 하나가 되었다⁵⁾.

골관절염은 임상적으로 관절의 만성적인 통증 및 강직감, 부종, 염발음, 관절 변형, 운동범위의 제한, 근력 약화 등의 증상이 발생하는 퇴행성 질환이다⁶⁾. 골관절염은 손, 발 등의 소관절에도 발생하지만⁶⁾, 주로 체중부하가 많은 관절에 발생한다¹⁾. 특히 최근 발표된 'GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators'에 따르면, 전 세계 골관절염 환자의 약 87%가 무릎에 발생하는 것으로 보고되었다⁵⁾.

현재 골관절염의 주된 치료 목적은 통증과 부종을 감소시켜 증상을 완화하는 것으로 약물치료, 물리치료, 주사치료, 수술치료 등이 시행된다³⁾. 우선적으로 보존적 치료가 권장되며, 약물치료의 경우 특히 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 장복하는 경우가 많다⁷⁾. 그러나 NSAIDs를 장복할 경우 위장관 질환이나 신독성 등의 부작용을 겪을 수 있으므로⁸⁾, 약물로 인한 부작용을 줄이면서 수술

을 대체할 수 있는 줄기세포 치료, 혈장치료, 유전자 치료 등에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다³⁾.

한의학에서 골관절염은 대개 '痺症'의 범주로 인식되며, '歷節風', '鶴膝風', '脚氣'의 범주에 속하기도 한다. '痺症'은 관절을 중심으로 風寒濕邪의 邪氣가 經絡으로 침입하여 관절의 기혈이 응체되는 것으로, 병리적으로 기혈순행이 저해되어 생기는 것이므로 '宣通'의 방식으로 치료하게 된다⁶⁾. 골관절염의 치료를 위한 침구, 약물, 약침, 매선요법, 테이핑요법 등에 대한 연구들이 진행되었으며, 이를 통해 한방치료가 골관절염에 있어서 연골세포의 재생, 연골조직의 보호, 진통작용 등을 지닌 이 밝혀졌다⁹⁾.

동물모델에서 골관절염에 대한 한약 연구의 경우 大防風湯¹⁰⁾, 三氣飲¹¹⁾, 疏風活血湯¹²⁾, 防己黃芪湯¹³⁾ 등 다양한 처방을 이용한 연구들이 행해졌다. 그러나 골관절염에 있어서 임상에서 빈용하는 大羌活湯¹⁴⁾에 대한 연구는 아직까지 없었다. 大羌活湯은 《東醫寶鑑》雜病編의 風門에 수록되어 있는 처방으로서 羌活, 獨活을 군약으로 하여 升麻, 蒼朮, 防己, 威靈仙, 白朮, 當歸, 赤茯苓, 澤瀉, 甘草로 이루어져 있다¹⁵⁾. 風濕이 相搏하여 肢節腫痛, 不可屈伸하며 팔다리 관절이 붓거나 아파 잘 움직이지 못하는 경우에 祛風濕, 通經絡, 止痛하기 위해 사용되며^{15,16)}, 관절염에 있어서 임상에서 빈용되는 처방이다. 관절염에 있어서 大羌活湯에 대한 연구로는 collagen¹⁷⁻¹⁹⁾, carrageenan²⁰⁾, completed freund's adjuvant(CFA)²¹⁾로 유발한 동물 모델을 대상으로 하여 관절염 진행 억제 및 진통효과 등이 있음이 밝혀졌다. 하지만 주입하는 농도에 따라 골관절염의 정도를 쉽게 조절할 수 있기 때문에 골관절염 유도에 주로 사용되는 약물인 monosodium iodoacetate(MIA)를 사용한 연구는 찾아

*Corresponding author : Jae Soo Kim, Department of Acupuncture & Moxibustion medicine, Daegu Oriental hospital of Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea
Tel : +82-53-770-2108, Fax : +82-53-770-2055, E-mail : jaice@daum.net

•Received : August 19, 2021 / Revised : August 26, 2021 / Accepted : August 27, 2021



볼 수 없었다^{22,23}). 이에 본 저자는 MIA를 주입하여 골관절염을 유발시킨 흰쥐에 대해 4주 간 大羌活湯을 경구 투여한 후, 슬관절 연골의 육안적 관찰, 병리조직학적 관찰 및 염증성 cytokine, 연골 손상 및 연골 손상 방어 관련인자를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코(경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐 40마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도(23~24°C)와 습도(40~60%)가 유지되고, 12시간 명암이 자동 조절되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하였으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호:R2020-015).

2. 大羌活湯 시료 추출

본 연구에 사용된 大羌活湯은 《東醫寶鑑》¹⁵⁾에 기재된 용량에 준하여 사용하였으며(Table 1), 사용된 약재는 (주)나눔제약을 통해 구입하였다. 大羌活湯 5첩분량인 192 g을 시료 중량의 약 10배인 증류수 2 L를 용매로 하여 round flask에 담은 후, 냉각기를 부착한 전탕기에 2시간 동안 전탕한 다음 한약부직포를 사용하여 여과하였다. 여과액은 1 L rotary evaporator을 이용하여 감압농축한 후 동결건조 시켜 물추출 엑기스 23.3g(수득률 12.1%)을 얻었다.

3. 실험동물의 골관절염 유발

MIA를 사용하여 실험동물의 골관절염을 유발하였다. 실험동물인 흰쥐를 diethyl ether로 마취시키고 멸균 생리식염수에 MIA(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 2 mg을 전체 용량이 50 μ l가 되도록 하여 29 gauge 인슐린 주사기를 사용하여 좌측 슬관절강 내로 천천히 주입하였다. MIA를 주입 한 후 1주 이내에 골관절염 유발로 인한 보행 장애 및 통증 반응을 보이지 않는 실험동물은 배제하였으며, MIA를 주입한 날부터 일주일간 적응기를 가진 후 골관절염이 유발되지 않은 흰쥐는 배제한

후 4주간 약물을 경구 투여하였고, 그 후 실험동물을 희생하여 변화를 관찰하였다.

4. 실험군의 분리와 약물 투여

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 8마리씩 나누어 normal군, control군, Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군 다섯 군으로 분리하였다. Control군, Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에는 좌측 슬관절강 내에 MIA를 주입하여 골관절염을 유도하였으며, normal군에는 동일한 방식과 용량으로 멸균 생리식염수를 주입하였다. 이후 normal군, control군에는 증류수 2 ml을 경구 투여하였고, Indomethacin군에는 indomethacin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)을 2 mg/kg의 농도로 2 ml 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

DGHT 투여량 결정은 60 kg 성인이 하루에 大羌活湯 2첩(76.8 g)을 복용한다고 했을 때, 체중 비례로 환산하면 kg당 1280 mg의 大羌活湯을 복용한 것이 된다. 이를 흰쥐에 동일하게 적용하여, DGHT(L)군에는 大羌活湯 1280 mg/kg을, 고용량 군인 DGHT(H)군에는 2배 용량인 大羌活湯 2560 mg/kg을 각각 2 ml 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

전체 실험기간 동안 물과 사료는 모든 군에서 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 골관절염 유도 후 증류수 및 약물의 경구 투여는 4주간 1일 1회 오전 10시에 시행되었다.

5. 체중측정

실험기간 동안 매일 오전 약물의 경구 투여 직전에 실험동물의 체중을 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 체중을 측정하였다.

6. 슬관절 연골의 육안적 관찰

좌측 대퇴골의 원위단과 경골의 근위단의 관절 연골 주변을 깨끗이 정리하여 사진 촬영한 후, 관절 연골 표면의 상태를 육안으로 관찰하였다.

7. 슬관절 연골의 조직학적 검사

1) Hematoxylin-Eosin 염색 관찰

각 실험군의 실험동물로부터 채취한 경골 근위단 조직을 중성 formalin에 고정한 후, 파라핀으로 고정하였다. 경골 연골에 수직 방향으로 8 μ m 두께의 조직 절편을

연은 후 hematoxylin과 eosin을 이용하여 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 시행하였으며, 연골세포와 세포외 기질의 변성에 주안점을 두고 현미경 하에서 조직학적 소견을 관찰하였다.

2) 슬관절 연골의 두께 측정

실험동물의 슬관절 연골 두께 변화를 측정하기 위해 H&E 염색을 시행한 후 촬영하였다. 촬영한 영상 분석을 통해 연골 정중앙부의 두께를 측정하여 두께 변화를 측정하였다. 연골 두께는 골 피질선과 연골 표면의 경계가 명확한 경우에 한하여 종단면에서 연골 표면에 수직이 되는 방향으로 측정하였다.

3) Safranin O 염색 관찰

조직 절편은 탈파라핀 및 함수처리과정을 거친 후 hematoxylin 용액에 약 10분간 염색한 후 세척하였다. 이어서 0.02% fast green FCF 용액으로 5분간 염색한 후, 0.1% acetic acid 용액에 반응시킨 다음 0.1% safranin O 용액에 5분간 염색하였다. 이후 충분히 세척하여 실험동물 슬관절 연골에서의 proteoglycan 변성 정도를 관찰하였다.

8. 슬관절 연골의 면역조직화학염색

슬관절 연골의 면역조직화학염색을 통해 大羌活湯의 항염증 효과, 연골 손상 억제 및 연골 보호 효과를 파악하고자 하였다. 大羌活湯의 항염증 효과를 파악하기 위해 슬관절 연골 내의 염증 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6)를 분석하였고, 연골 손상 억제 및 연골 보호 효과를 파악하기 위해 슬관절 연골 손상 관련인자인 matrix metalloproteinase-13(MMP-13)과 슬관절 연골 손상 방어 관련인자인 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), glycosaminoglycans(GAGs)를 분석하였다. 염색법은 자유부유법(free-floating)²⁴⁾을 사용하였으며, 염색에 사용된 primary antibody는 anti-TNF- α (AB6671, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Abcam), anti-IL-1 β (SC52012, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz) 및 anti-IL-6(SC28343, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz), anti-MMP-13(SC-101564, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz), anti-GAGs(MABT819, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Sigma- Aldrich Co.), anti-TIMP-1(SC-21734, 1:200

dilution, rabbit polyclonal; Santacruz)을 사용하였다.

Phosphate buffer saline(PBS)와 Triton X-100을 혼합한 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, 조직을 PBS로 씻어내고 abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain kit)²⁵⁾에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. 면역반응의 결과를 정량화하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정 면적 내의 면역 양성반응 세포 수를 측정하여 수치화하였다.

9. 혈액학적 검사

大羌活湯을 경구 투여한 후 발생하는 혈액학적 변화를 관찰하였다. 大羌活湯을 마지막으로 투여한 다음 날 흰쥐를 CO₂로 마취시킨 후 복대정맥에서 채혈한 전혈 일부를 EDTA로 항응고 처리한 후, 혈구자동측정기를 이용하여 white blood cell(WBC), red blood cell(RBC), hemoglobin(Hb), hematocrit(HCT), platelet, mean cell volume(MCV), mean cell hemoglobin(MCH), mean cell hemoglobin concentration(MCHC)을 측정하였다.

10. 혈액생화학적 검사

채혈한 전혈 일부를 15분간 원심분리한 후 혈청을 얻어 혈청자동분석기를 이용하여 total protein, albumin, total bilirubin, alkaline phosphatase(ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), total cholesterol, triglycerides(TG), glucose, creatinine, blood urea nitrogen(BUN)를 측정하였다.

11. 간과 신장의 해부조직학적 관찰

大羌活湯을 4주간 투여한 후 각 실험군의 흰쥐로부터 간과 신장을 적출하여 형태적인 변화를 관찰하고 H&E 염색을 통해 병변 유무와 해부조직학적 변화를 관찰하였다.

12. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인한 뒤, Student's t-test를 사용하여 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였다. 통계에 사용된 프로그램은 SAS(version 9.1.3, SAS Institute Inc.)를 사용하였다.

III. 결과

1. 체중 변화에 미치는 영향

4주간의 실험기간 동안 모든 실험군에서 흰쥐의 체중이 점차 증가하였다. 실험 개시 당일 각 군별 흰쥐의 평균 체중은 normal군, control군, Indomethacin군, DGHT(L)군 및 DGHT(H)군에서 각각 259.4±4.6 g, 260.9±2.9 g, 259.8±1.6 g, 259.5±2.1 g, 260.8±2.3 g 이었고, 4주 후 마지막으로 측정된 체중은 322.3±8.5 g, 321.9±12.1 g, 319.5±12.9 g, 317.0±12.1 g, 319.9±18.5 g 이었으며, 각 실험군 간의 유의성 있는 차이는 없었다 (Fig. 1).

2. 슬관절 연골의 육안적 관찰

4주간의 실험기간이 종료된 후 슬관절 연골을 육안으로 관찰한 결과, normal군의 경우 대퇴골과 경골의 관절 연골 표면은 윤기있고 매끈한 상태로, 연골표면 소실이나 골극 형성 등의 변화가 관찰되지 않았다. 반면, control군의 경우 연골 표면이 거칠게 변화되었고, 윤기가 감소하였다. 또한 연골이 국소적으로 손상 혹은 불규칙한 형태로 손상되어 있었으며 부위에 따라서 작은 골극들이 관찰되기도 하였다. Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군의 경우에도 연골 표면의 변화가 관찰되었으나 control군에 비해 상대적으로 연골 손상 정도가 적었다(Fig. 2).

3. 슬관절 연골의 조직학적 검사

1) H&E 염색

각 실험군에서 흰쥐의 슬관절 연골 조직을 적출한 후 H&E 염색을 통해 조직학적 변화를 관찰한 결과, normal군은 연골조직과 연골세포가 정상 소견을 보였다. 하지만 control군은 국소적인 연골 손상으로 인해 normal군에 비해 연골 두께가 현저히 감소되어 있었다. Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서는 관절연골의 변성이 관찰되었으나, control군에 비해 상대적으로 연골 손상 정도가 적었다(Fig. 3).

2) 슬관절 연골의 두께 변화

슬관절 연골의 정중앙부를 촬영한 영상분석을 통해 연골의 평균 두께를 측정하여 비교한 결과, normal군과 control군은 각각 255.3±7.8 μm , 123.9±6.9 μm 로 측정되어 control군이 normal군에 비해 연골 두께가 유의성

있게 감소하였다($p<0.01$). 반면, Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서 연골의 평균 두께는 각각 197.1±10.2 μm , 143.3±7.1 μm , 162.0±12.8 μm 로 control군에 비해 연골 두께 감소가 유의성 있게 적었다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 연골 두께는 Indomethacin군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, DGHT(L)군보다 DGHT(H)군에서 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$)(Fig. 4).

3) Safranin O 염색

각 실험군에서 흰쥐의 슬관절 연골 조직을 적출한 후 safranin O 염색을 시행하여 조직학적 변화를 관찰한 결과, normal군에서는 연골증식영역에서 정상 소견의 염색 양성 반응이 관찰되었고, control군에서는 관절염이 유도된 면 중 남아있는 연골증식영역에서만 관찰되었다. Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서는 control군에 비해 상대적으로 많은 연골증식영역에서 염색 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 5).

4. 슬관절 연골의 면역조직화학염색

1) 슬관절 연골 염증성 cytokine의 발현

(1) TNF- α 의 발현

슬관절 연골 내 TNF- α 는 normal군에서는 19.9±4.0 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 84.7±7.4 cells/120,000 μm^2 로 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군은 73.8±11.8 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였고($p<0.05$), Indomethacin군과 DGHT(H)군 역시 각각 47.4±10.4 cells/120,000 μm^2 , 66.1±12.3 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 TNF- α 의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 6A).

(2) IL-1 β 의 발현

슬관절 연골 내 IL-1 β 는 normal군에서는 19.8±2.9 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 68.3±5.7 cells/120,000 μm^2 로 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군은 60.6±8.0 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였고($p<0.05$), Indomethacin군과 DGHT(H)군 역시 각각 40.7±6.3 cells/120,000 μm^2 , 53.0±6.7

cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 IL-1 β 의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 6B).

(3) IL-6의 발현

슬관절 연골 내 IL-6는 normal군에서는 13.8 ± 3.4 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 59.0 ± 6.1 cells/120,000 μm^2 로 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군은 51.3 ± 6.7 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소되었고($p<0.05$), Indomethacin군과 DGHT(H)군 역시 각각 34.0 ± 6.2 cells/120,000 μm^2 , 45.3 ± 6.7 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소되었다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 IL-6의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 6C).

2) 슬관절 연골 손상 관련인자의 발현

(1) MMP-13의 발현

슬관절 연골 내 MMP-13은 normal군에서는 17.7 ± 3.7 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 71.0 ± 7.9 cells/120,000 μm^2 로 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군은 62.5 ± 6.5 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였고($p<0.05$), Indomethacin군과 DGHT(H)군 역시 각각 35.0 ± 6.4 cells/120,000 μm^2 , 53.5 ± 6.3 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 MMP-13의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군보다 DGHT(H)군에서 발현이 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 7).

3) 슬관절 연골 손상 방어 관련인자의 발현

(1) TIMP-1의 발현

슬관절 연골 내 TIMP-1은 normal군에서는 10.6 ± 1.9 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 21.3 ± 4.6 cells/120,000 μm^2 로 유의성 있게 발현이 증가하였다($p<0.01$). Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군은 각각 47.5 ± 5.8 cells/120,000 μm^2 ,

34.2 ± 5.4 cells/120,000 μm^2 , 40.3 ± 6.8 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군에서 TIMP-1의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 감소하였고($p<0.01$), DGHT(H)군에서 역시 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 8A).

(2) GAGs의 발현

슬관절 연골 내 GAGs는 normal군에서는 4.7 ± 1.1 cells/120,000 μm^2 로 미약하게 발현되었으나, control군에서는 13.8 ± 2.5 cells/120,000 μm^2 로 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군은 18.4 ± 4.1 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 증가하였고($p<0.05$), Indomethacin군과 DGHT(H)군 역시 각각 37.3 ± 3.7 cells/120,000 μm^2 , 24.3 ± 3.5 cells/120,000 μm^2 로 control군에 비해 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$). DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 MMP-13의 발현은 Indomethacin군에서보다 유의성 있게 감소하였으며, DGHT(L)군보다 DGHT(H)군에서 발현이 유의성 있게 증가하였다($p<0.01$)(Fig. 8B).

5. 혈액학적 검사

혈액학적 지표들을 검사하였으나, 각 실험군들 간에 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

6. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 지표들을 검사하였으나, 각 실험군들 간에 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 3).

7. 해부조직학적 관찰

1) 간의 해부조직학적 변화

간을 적출한 후 H&E 염색을 통하여 간 조직을 관찰한 결과, normal군의 간 조직에서 간문맥과 간실질이 정상적인 구조를 유지하고 있었고, 조직학적으로 정상적 소견이 관찰되었다. Control군, Indomethacin군, DGHT(L)군과 DGHT(H)군의 경우에도 간 조직에서 간세포의 괴사, 염증세포 침윤, 혹은 지방변성 등의 변화를 관찰할 수 없었으며, normal군과 비교하여 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다(Fig. 9A).

2) 신장의 해부조직학적 변화



신장 조직의 변화를 관찰한 결과에서도 실험군 모두에서 조밀한 세포질과 함께 정상적인 사구체, 곡세뇨관 및 상피세포가 관찰되었으며, 각 군 간의 유의성 있는 차이점은 발견되지 않았다. 또한, 모든 실험군에서 세뇨관의 팽창, 표피박리, 혹은 세포사멸 등의 변화도 발견되지 않았다(Fig. 9B).

IV. 고찰

퇴행성 관절염이라고도 불리는 골관절염은 서서히 진행되며²⁶⁾, 초기에는 통증을 제어하기 어렵지 않으나 만성화되면 일상생활에 장애를 초래하여 삶의 질을 위협하는 중요한 질환 중 하나가 될 수 있다²⁷⁾. 골관절염의 이환율은 세계적으로 증가추세에 있을 뿐만 아니라 우리나라에서도 건강보험 심사 평가원에서 가장 최근에 발표한 '2019 건강보험 통계연보'에 따르면, 12개의 만성질환으로 치료받은 환자 1880만 명 중 관절염으로 치료받은 환자는 502만 명으로 고혈압에 이어 두 번째로 높은 빈도를 차지하였다²⁸⁾.

골관절염은 관절연골, 연골하골, 인대, 관절낭, 활막, 관절 주위 근육의 구조적인 변화를 포함하는 광범위한 질환으로서^{29,30)}, 기계적 요인, 염증성 및 대사성 요인 등에 의해 관절 조직의 회복과 손실 간의 불균형이 발생하게 되면서 유발되는 질환이다³¹⁾. 병리학적인 진단으로 관절연골의 손실이 필수적이며²⁶⁾, 골관절염 초기에는 연골 표면에서만 침식이 일어나지만, 골관절염이 진행될수록 더 깊은 곳까지 침식이 일어나며 골극이 형성되어 관절 간 공간이 좁아지게 된다. 또한 골관절염의 회복 과정에서 증식된 연골세포는 인접 활막에 작용하여 염증 전단계를 자극하는 기질분해산물과 염증 매개체를 생성하고, 활막세포는 염증유발물질을 방출하며, 주변 조직의 혈관분포가 증가하기도 한다^{32,33)}.

골관절염의 주된 치료 목적은 통증과 부종을 감소시켜 증상을 완화시킴으로써 삶의 질을 향상시키는 것으로, 보존적 치료가 우선시된다. 최근에는 약물치료 이외에도 신경성장인자 항체(nerve growth factor antibodies) 주사, 골수중간엽 줄기세포(bone marrow mesenchymal stem cell) 주사, 자가혈치료술(platelet-rich plasma, PRP), 지방유래세포(stromal vascular fraction) 주사 등을 이용한 치료가 이루어지고 있으며, 유전자를 이용한 치료에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다³⁴⁾.

본 연구에 사용된 大羌活湯은 《東醫寶鑑》雜病編의

風門에 수록된 처방으로 羌活, 獨活을 군약으로 하여 升麻, 蒼朮, 防己, 威靈仙, 白朮, 當歸, 赤茯苓, 澤瀉, 甘草로 이루어져 있다. 祛風濕, 通經絡, 止痛하기 위해 사용되며, 특히 군약으로 쓰인 羌活과 獨活은 in vitro 실험에서 그람 음성균의 외막성분인 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 염증물질에 있어서 유의한 항염증 효과를 지니고 밝혀졌다³⁵⁻³⁷⁾. 그 중에서도 獨活의 경우에 MIA로 유발한 골관절염 흰쥐 모델에 있어서 항염증, 연골 파괴 완화 및 진통효과가 있음이 밝혀졌다³⁷⁾. 이를 바탕으로 본 연구에서는 MIA로 유발한 골관절염 흰쥐 모델을 이용하여 골관절염 치료 목적으로 임상에서 사용되는 처방인 大羌活湯¹⁴⁾의 효능을 평가하고자 하였다. 또한 大羌活湯의 효능을 보다 객관적으로 평가하기 위해 항염증효과를 가진 indomethacin을 경구 투여한 군을 양성대조군으로 설정하여 실험을 진행하였다. Indomethacin은 NSAIDs의 대표적인 약물로서 통증, 발열 및 염증과 관련된 요인의 합성을 억제하여 진통 및 해열 작용을 한다. 중등도에서 중증의 골관절염, 활액낭염이나 건염으로 인한 급성의 어깨 통증, 중증 류마티스 관절염 등의 증상관리를 위해 이용되는 약물이다³⁸⁾.

본 연구에서 실험군은 골관절염을 유발하지 않고 증류수를 경구 투여한 정상군(normal군)과 MIA로 골관절염을 유발한 후 증류수를 경구 투여한 대조군(control군), MIA로 골관절염을 유발한 후 indomethacin 2 mg/kg을 경구 투여한 양성대조군(Indomethacin군), MIA로 골관절염을 유발한 후 大羌活湯을 저농도로 투여한 군(DGHT(L)군), MIA로 골관절염을 유발한 후 大羌活湯을 고농도로 투여한 군(DGHT(H)군)으로 총 5개의 군으로 나누어 실험을 진행하였으며, 배정받은 군에 따라 증류수 또는 약물을 4주간 경구 투여한 후 실험동물을 희생하여 슬관절 연골에 미치는 영향을 분석하였다.

우선, 大羌活湯이 체중변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 4주간의 실험기간동안 매일 체중을 측정하였다. 실험기간 동안과 실험 종료 후 모든 실험군에서 흰쥐의 체중은 증가하였으며, 실험 종료 후 골관절염을 유발시킨 control군, Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서 흰쥐의 체중 증가 정도는 normal군에 비해 적었다. 이는 MIA 주입 후 실험동물의 체중이 감소하였다는 이전 연구들^{39,40)}과 일치하는 결과였지만, 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

MIA를 주입하여 관절연골에 손상을 유발시킨 후, 4주간의 실험기간이 종료된 후 슬관절을 이루는 대퇴골

과 경골의 관절면을 육안으로 관찰한 결과, 연골 표면이 매끄러운 normal군에 비해 골관절염을 유발시킨 control군, Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서는 연골 표면이 거칠게 변하고 윤기가 감소했다. 추가적으로 control군의 연골 표면에서는 국소적으로 선상 혹은 불규칙한 형태의 손상이 관찰되었으며, 골극이 관찰되기도 하였다. Indomethacin군, DGHT(L)군, DGHT(H)군에서는 control군에 비해 연골 표면의 변화가 상대적으로 보존되어 있었다.

골관절염의 병리조직학적 검사는 각 실험군 흰쥐의 슬관절 연골 조직에 대해 연골 및 활막 조직의 손상을 관찰할 수 있는 H&E 염색과 연골에 분포하는 proteoglycan의 농도 변화를 추정할 수 있는 safranin O 염색을 통해 진행되었다⁴¹⁾. Proteoglycan은 정상적인 관절연골에서 세포외 기질의 주성분으로, 정상 연골세포에 의해 계속 만들어지는 동시에 연골세포에서 분비되는 MMPs로 인해 파괴되기도 하여 관절 내 농도 균형을 유지하면서 관절을 보호해주는 역할을 한다⁴²⁾.

H&E 염색 후 조직학적 검사를 시행하였을 때, normal군은 연골 조직과 연골세포가 정상 소견으로 관찰되었다. 하지만 control군은 국소적인 연골 손상으로 인해 normal군에 비해 연골 두께가 현저히 감소하였다. DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서는 관절연골의 변성이 관찰되었으나 control군에 비해 상대적으로 보존되어 있었으며, 고농도 군인 DGHT(H)군에서 연골이 조금 더 보존되어 있었다.

Safranin O 염색 후 조직학적 검사를 시행하였을 때 역시, normal군에서는 정상 소견의 연골증식영역에서 proteoglycan이 관찰되었고, control군에서는 관절염이 유도된 면 중 남아있는 연골증식영역에서만 proteoglycan이 관찰되어 proteoglycan 층이 파괴되었음을 알 수 있었다. DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서는 연골증식영역의 proteoglycan 층의 형태가 비교적 보존되어 있었으며, control군에 비해서 상대적으로 덜 손상된 모습이었다. 실제 연골의 평균 두께를 측정하였을 때 역시, 동일한 결과를 관찰할 수 있었다. 이를 통해 大羌活湯이 proteoglycan 층의 손상을 억제하고, 연골의 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

골관절염에서 관절 연골에 기계적 자극이 가해지면 연골세포가 조직의 손상이나 변화를 감지하게 되는데, 이 때 염증성 cytokine과 염증성 매개인자에 의해 연골세포의 동화, 이화작용 사이의 평형이 저해된다²⁶⁾. 그

과정에서 특히 이화작용, 즉 연골 손상에 관여하는 염증성 cytokine이 중요한 역할을 하며, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등이 주요하게 작용한다^{26,43,44)}. 골관절염 환자들에서 연골세포에 의해 TNF- α , IL-1 β 가 일차적으로 발현되면, MMPs, iNOS, COX-2 등의 발현이 유도되고 TIMPs 등을 억제하여 이화작용을 주도하게 된다. 또한 TNF- α , IL-1 β 는 IL-8, IL-6, NO, PGE2 등을 생산시켜 염증반응을 주도한다²⁶⁾.

TNF- α 는 대식세포와 단핵구에 의하여 생산되어 다양한 세포활동에 작용하는 상위 cytokine으로서, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17 및 MMPs와 같은 하위의 여러 염증매개물질의 분비를 유발하여 염증을 확대시키고^{34,43)}, proteoglycan의 소실 및 재합성을 억제함으로써 연골의 손상과 골관절염의 진행을 촉진시킨다^{34,45)}. IL-1 β 는 연골분해를 일으키는 강력한 cytokine으로, 연골 기질의 파괴를 촉진시키고, 통각 과민을 유발하며 일차 구심성 신경 섬유를 자극하여 통증을 발생시킨다^{43,46)}. IL-6는 TNF- α , IL-1에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질로서²⁶⁾, 활막세포의 증식 및 파골세포의 활동을 촉진시키고 혈청에서보다 관절염으로 손상된 관절의 활막막이나 관절 조직의 혈관에서 더 활성화되기 때문에 면역반응의 매개체로서 중요한 역할을 담당한다⁴⁷⁾. 본 연구에서 관찰한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 와 같은 염증성 cytokine들은 연골 손상에 관여하기 때문에, 골관절염을 치료할 때 핵심요소로 여겨진다. TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현은 DGHT(L)군과 DGHT(H)군 모두에서 control군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

MMPs는 칼슘 및 아연 의존성 기질단백분해효소로서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 거의 모든 구성요소를 분해할 수 있으며⁴⁸⁾, 주로 조직 리모델링, 상처치유 및 면역과 같은 항상성 유지를 위해 작용한다⁴⁹⁾. 그 중에서도 특히 MMP-13은 일차적으로 type 2 collagen을 표적으로 하여 콜라겐 분해를 활성화시켜 골관절염의 진행 즉, 연골 손상에 가장 강력하게 작용한다⁴⁹⁻⁵¹⁾. 그러나 노년기에 접어들면 MMPs의 과다한 발현이 연골세포의 침윤과 섬유화, 종양 등의 원인이 되어 병리적 상황이 나타나게 된다⁵²⁾. 이와 같은 상황을 해결하기 위해 최근 MMPs에 의한 단백질 분해를 조절하는 내인성 인자인 TIMPs에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{53,54)}. TIMPs는 MMPs의 발현을 억제하고, 이를 통해 MMPs에 의한 ECM의 단백질 분해를 억제하게 된다⁵⁵⁾. 이들 TIMPs-MMPs간의 균형을 통해

ECM을 리모델링하여 연골세포의 동화, 이화작용을 조절하는 것으로 알려져 있다^{55,56}. 특히, TIMP-1의 경우 여러 염증반응의 병리에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에 주목받고 있다⁵⁷. GAGs는 주로 탄력성과 관련하여 관절연골에서 콜라겐을 보호하며, 관절 연골의 주요 성분인 proteoglycan을 만드는 것으로 알려져 있다^{58,59}. 본 연구에서 MMP-13, TIMP-1, GAGs를 분석한 결과, MMP-13의 발현은 DGHT(L)군과 DGHT(H)군에서 control군에 비해 유의성 있게 감소한 반면, TIMP-1과 GAGs의 발현은 control군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 大羌活湯이 염증성 cytokine의 생성을 억제시켜 연골 손상을 방지하며, 이를 통해 MMP-13의 분비를 억제시키고, GAGs의 분비를 증가시켜 연골을 보호하는 효과 지니는 것으로 사료된다. 또한 TIMP-1 역시 증가하여 MMPs의 발현을 억제함으로써 연골을 보호하는 것으로 사료된다. 다만, 골관절염에 있어서 본 연구에서 분석한 MMP-13, TIMP-1 이외에도 MMP-1, 2, 9⁶⁰, TIMP-2⁵⁵ 등이 중요한 지표로 주목받고 있기 때문에 추후 진행될 연구에서는 보다 다양한 MMPs와 TIMPs에 대해 분석하여 大羌活湯이 구체적으로 골관절염의 어떤 기전에 영향을 미치는지 분석할 필요가 있다. 또한 본 연구에서 항염증작용을 알아보기 위해 분석한 염증성 cytokine 수치 외의 NO, iNOS, COX-2, PGE2 등 다른 염증 매개인자들에 대한 분석을 보강하여 골관절염에 대한 大羌活湯의 보다 구체적인 항염증 기전에 대한 연구 역시 필요할 것이다.

본 연구를 통해 大羌活湯이 MIA로 유발한 골관절염 흰쥐 모델에 있어서 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성과 MMP-13의 분비를 억제하고 TIMP-1의 발현을 촉진시켜 항염증 작용을 하며, proteoglycan 층의 손상을 억제하고 GAGs의 분비를 증가시켜 연골 손상 억제 및 연골 보호 효과가 있음이 밝혀졌다. 모든 평가지표에서 DGHT(H)군이 DGHT(L)군보다 유효성 있는 경향성이 관찰되었고, 특히, 슬관절 연골의 두께변화, MMP-13 및 GAGs의 발현에 있어서 유의성 있는 차이가 있었다. 大羌活湯을 투여한 군이 모든 평가지표에서 Indomethacin군의 결과와는 미치지 못하였다. 그렇지만 大羌活湯의 효과가 용량 의존적인 경향성을 지닌 것으로 추정되므로 보다 높은 용량으로 大羌活湯을 투여한다면, indomethacin과 비슷한 효과가 나타나지 않을까 기대한다. 더불어, 大羌

活湯의 안전성 여부를 판단하기 위해 실험 기간 중 시행한 혈액학적, 혈액생화학적 검사에서 각 실험군 간에 유의한 차이나 이상소견이 관찰되지 않았고, 간과 신장 조직을 실제적으로 분석한 결과에서도 병적 이상 소견이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 사람을 대상으로 한 임상 연구를 통해 大羌活湯의 항염증 및 연골 보호 효과에 대한 후속 연구 역시 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 MIA로 골관절염을 유발시킨 흰쥐에게 大羌活湯을 4주간 경구 투여한 후 슬관절 연골의 육안적 및 조직학적 변화, 염증성 cytokine과 연골 손상 및 연골 손상 방어 관련인자의 변화를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 大羌活湯은 슬관절 연골의 손상을 억제시키고, 연골 두께의 감소를 유의성 있게 억제하였다.
2. 大羌活湯은 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 연골 손상 관련인자인 MMP-13의 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 大羌活湯은 연골 손상 방어 관련인자인 TIMP-1과 GAGs의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
4. 大羌活湯의 안전성 여부를 판단하기 위해 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 간과 신장 조직을 분석한 결과, 각 실험군들 간에 유의한 차이는 없었다.

이상의 결과를 종합적으로 분석하였을 때, 흰쥐에서 MIA로 유발된 골관절염에 大羌活湯이 항염증 효과를 지니며, 연골 손상 억제 및 연골 보호에 효과적인 것으로 사료된다.

References

1. Korean acupuncture & moxibustion medicine society. Acupuncture medicine. Seoul (Korea): Hanmibook; 2016. p. 550, 564-8, 576-9, 583.
2. Korean pharmacopuncture institute. Pharmacopunctureology. 2nd ed. Seoul (Korea): Elsevier Korea; 2011. p. 181-215.
3. David JH, Sita BZ. Osteoarthritis. Lancet. 2019;

- 393(10182):1745-59.
- Carlson AK, Rawle RA, Wallace CW, Brooks EG, Adams E, Greenwood MC, et al. Characterization of synovial fluid metabolomic phenotypes of cartilage morphological changes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(8):1174-84.
 - GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
 - The society of Korean medicine rehabilitation. *Korean rehabilitation medicine*. 4th ed. Paju (Korea): Koonja Publishing; 2015. p. 102-16.
 - Nelson AE, Allen KD, Golightly YM, Goode AP, Jordan JM. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the US bone and joint initiative. 2014;43(6):701-12.
 - Kim HA. The management of arthritis. *Journal of the Korean Medical Association*. 2007;50(8):743-50.
 - Yoh SB, Sul JU, Shin MS. Research trends on the treatment of knee osteoarthritis in Korean medicine. *Korean Journal of Acupuncture*. 2011;28(1):139-55.
 - Park WT. Effects of *Daebangpung-tang* on the monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [dissertation]. Jecheon: Semyung University; 2008.
 - Lee KM. Effects of *Samgieum* treatment on the monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [dissertation]. Jecheon: Semyung University; 2008.
 - Kim DH. Suppression effects of *Sopunghwalhyeol-tang* on the monosodium iodoacetate -induced osteoarthritis in rats [dissertation]. Jecheon: Semyung University; 2010.
 - Kim DH. Effects of *Bangkeehwangkee-tang* treatment on the monosodium iodoacetate -induced osteoarthritis in rats [dissertation]. Naju: Dongsin University; 2013.
 - Kim DH, Lee DE, Noh JW, Ahn YM, Ahn SY, Lee BC. A study of the co-administration of herbal and western medicines to hospitalized patients with osteoarthritis. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;39(2):97-106.
 - Heo J. *Treasured mirror of eastern medicine*. 5th ed. Hadong (Korea): Dongeuibogam publisher; 2016. p. 1027.
 - Bae BC. *Standard clinical oriental medical prescription*. Seoul (Korea): Seongbosa; 1995. p. 398-9.
 - Jeong SH, Kim SJ, Seo IB. Anti-pathogenetic and curative effects of *Taeganghwal-tang* (daqianghuo-tang) on the collagen-induced arthritis in wistar rats. *J Oriental Rehab Med*. 2004;14(3):79-101.
 - Lee HG, Jeong SH, Kim SS. Effects of *Daiganghwaltang* on change of IgG anticollagen antibody in type II collagen-induced arthritis. *J of Oriental physio therapeutics*. 1994; 4(1):87-94.
 - Kim MK, Oh MS. Inhibitory effects of *Gamidaeganghwal-tang* (jiaweidaqianghuo-tang) on rheumatoid arthritis induced by type II collagen. *J Oriental Rehab Med*. 2009;19(2):89-102.
 - An JH, Lee MJ. Effects of *Daeganghwal-tang*(daqianghuoshang) on the carrageenan-induced arthritis in animal model. *J Oriental Rehab Med*. 2006;16(2):79-96.
 - Seo YJ, Koo ST, Yang YJ, Kim S, Yoo IS, Lim KS. Analgesic effect of *Daeganghwal-tang* on a rat model of CFA-induced arthritis. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2004;21(4):83-99.
 - Seo IB, Park DS. Osteoarthritis model induced by monosodium iodoacetate: Good model for long-term drug efficacy test. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2015;25(4): 21-8.
 - Kim HA, Cheon EJ. Animal model of osteoarthritis. *J Rheum Dis*. 2012;19(5):239-47.
 - Shin KM, Ko IG, Kim SE, Jin JJ, Hwang L, Kim SH, et al. Low-frequency electroacupuncture improves locomotor function after sciatic crushed nerve injury in rats. *J Exerc Rehabil*. 2018;14(6):927-33.



25. Shao L, Liu Y, Xiao J, Wang Q, Liu F, Ding J. Activating metabotropic glutamate receptor 7 attenuates visceral hypersensitivity in neonatal maternally separated rats. *Int J Mol Med*. 2019;43(2):761–70.
26. The Korean orthopaedic association. *Orthopaedics*. 8th ed. Seoul (Korea): The new medical journal; 2020. p. 430–8.
27. Kim HA. Pharmacological treatment of osteoarthritis. *Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 2010;13(1):16–22.
28. HIRA, NHIS. National health insurance statistical yearbook, 2019 [Internet]. Wonju: HIRA, NHIS. 2020 Oct [cited 2020 Nov 26]. Available from: <https://www.hira.or.kr/bbsDummy.do?pgmid=HIRAA020045020000&brdScnBltno=4&brdBltno=2312&pageIndex=1#none>.
29. Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1261–4.
30. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16072.
31. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. Osteoarthritis: The genesis of pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(4):iv43–50.
32. Hsia AW, Emami AJ, Tarke FD, Cunningham HC, Tjandra PM, Wong A, et al. Osteophytes and fracture calluses share developmental milestones and are diminished by unloading. *J Orthop Res*. 2018;36:699–710.
33. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:412–20.
34. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee osteoarthritis: A review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations. *Genes (Basel)*. 2020; 11(8):854.
35. Lee DS. Effect of processed *aralia continentalis radix* extract on MIA-induced osteoarthritis in rats [dissertation]. Iksan: Wonkwang University; 2019.
36. Kim CM, Park YK. The effects of different extracts of *ostericum koreanum* on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2009;24(1):169–78.
37. Park HJ, Bae GS, Kim DY, Seo SW, Park KB, Kim BJ, et al. Inhibitory effect of extract from *ostericum koreanum* on LPS-induced proinflammatory cytokines production in RAW264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2008;23(3):127–34.
38. Drugbank. Indomethacin [Internet]. Edmonton: Drugbank. 2020 Dec 9 [cited 2020 Dec 9]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328>.
39. Marker CL, Pomonis JD. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol*. 2012;851:239–48.
40. Wang ZM, Chen YC, Wang DP. Resveratrol, a natural antioxidant, protects monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:763–70.
41. Lee SH, Kwon KD, Lee SW, Che SH, Ahn HS. Acetabular degeneration in osteonecrosis of the femoral head. *Journal of Korean Orthopaedic association*. 2004;39(3):239–46.
42. 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.
43. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:33–42.
44. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.
45. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861–74.
46. Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, Polanska M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondralbone. *Cytokine*. 2007;38(3):151–6.

47. Yang F, Zhou S, Wang C, Huang Y, Li H, Wang Y, et al. Epigenetic modifications of interleukin-6 in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients. *Sci Rep.* 2017;7:1-11.
48. Adamson A, Ghoreschi K, Rittler M, Chen Q, Sun HW, Vahedi G, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is preferentially expressed in Th1 and Th17 T-helper cell subsets and is a direct STAT target gene. *PLoS One.* 2013;8(3):e59367.
49. Tokito A, Jougasaki M. Matrix metalloproteinases in non-neoplastic disorders. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1178.
50. Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15 (1):R5.
51. Parrish AR. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in health and disease: Target tissues and therapy. San Diego (USA): Elsevier; 2017. p. 310.
52. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2000;18(5):1135-49.
53. Batra J, Robinson J, Mehner C, Hockla A, Miller E, Radisky DC, et al. PEGylation extends circulation half-life while preserving in vitro and in vivo activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *PLoS One.* 2012;7(11):e50028.
54. Li X, Fu X, Gao Y, Li H, Wang W, Shen Y. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and B-cell lymphoma-2 in the synovial membrane in patients with knee osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2018;15(1):885-9.
55. Ko JH, Kang YM, Yang JH, KIM JS, Lee WJ, KIM SH, et al. Regulation of MMP and TIMP expression in synovial fibroblasts from knee osteoarthritis with flexion contracture using adenovirus-mediated relaxin gene therapy. *Knee.* 2019;26(2): 317-29.
56. Lambert E, Dassè E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;49(3):187-98.
57. Hire JM, Evanson JL, Johnson PC, Zumbun SD, Guyton MK, McPherson JCI, et al. Variance of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) concentrations in activated, concentrated platelets from healthy male donors. *J Orthop Surg.* 2014;9:29.
58. Helminen HJ, Hyttinen MM, Lammi MJ, Arokoski JPA, Lapvetelaine T, Jurvelin J, et al. Regular joint loading in youth assists in the establishment and strengthening of the collagen network of articular cartilage and contributes to the prevention of osteoarthrosis later in life: A hypothesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2000;18(5):245-57.
59. Kim BS, Choi HI. Effect of intra-articular injection of sodium hyaluronate and polysulfated glycaosaminoglycan in equine degenerative joint disease. *The Korean journal of veterinary clinical medicine.* 1991;8(1):11-26.
60. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Meta-Analysis Genet Mol Res.* 2015;14(4):14811-22.



Table 1. The Composition and Amount of *Daeganghwal-tang*

Herb name	Pharmacognostic name	Amount(g)
羌活	Notopterygii Rhizoma	6.0
升麻	Cimicifugae Rhizoma	6.0
獨活	Angelicae Pubescentis Radix	4.0
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	2.8
防己	Stephaniae Tetrandrae Radix	2.8
威靈仙	Clematidis Radix	2.8
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	2.8
當歸	Angelicae Gigantis Radix	2.8
赤茯苓	Poria Sclerotium	2.8
澤瀉	Alismatis Rhizoma	2.8
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.8
Total Amount		38.4

Table 2. The Hematological Values of SD Rats

Index	Normal	Control	Indomethacin	DGHT(L)	DGHT(H)
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	4.69±0.79	4.23±1.17	4.22±0.92	4.35±0.93	4.14±0.89
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	7.51±0.41	7.62±0.95	7.93±0.82	7.64±0.61	7.86±1.03
Hemoglobin (g/dL)	9.85±0.73	9.88±0.69	9.97±0.87	10.1±0.85	10.11±0.97
HCT (%)	30.35±1.01	30.13±1.02	30.17±0.86	30.06±0.7	30.54±0.87
Platelet ($10^3/\mu\text{l}$)	940.35±15.11	938.48±10.8	931.39±14.37	924.94±35.25	928.06±17.27
MCV (fl)	41.39±1.55	42.84±5.15	41.29±2.15	42.5±3.02	41.74±2.9
MCH (pg)	12.92±0.69	12.9±1.1	13.39±0.72	13.01±1.48	13.16±0.71
MCHC (g/dL)	29.26±2.18	31.36±1.38	30.02±2.38	29.17±2.65	29.35±1.21

There were no significant differences among normal, control, Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups. SD: Sprague-Dawley, Normal: Normal SD rats group injected with normal saline at left knee joint and administrated orally distilled water, Control: MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally distilled water, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally indomethacin 2 mg/kg, DGHT(L): MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 1280 mg/kg of *Daeganghwal-tang*, DGHT(H): MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 2560 mg/kg of *Daeganghwal-tang*, WBC: White Blood Cell, RBC: Red Blood Cell, HCT: Hematocrit, MCV: Mean Cell Volume, MCH: Mean Cell Hemoglobin, MCHC: Mean Cell Hemoglobin Concentration

Table 3. The Serum Biochemical Values of SD Rats

Index	Normal	Control	Indomethacin	DGHT(L)	DGHT(H)
Total protein (g/dL)	5.06±0.38	4.98±0.33	4.93±0.3	5.07±0.31	4.9±0.27
Albumin (g/dL)	1.55±0.09	1.48±0.07	1.5±0.1	1.5±0.06	1.44±0.11
Total Bilirubin (mg/dL)	0.16±0.04	0.14±0.03	0.13±0.02	0.16±0.02	0.16±0.03
ALP (IU/L)	39.94±3.68	38.11±5.4	41.11±5.63	38.52±3.75	41.31±3.26
AST (IU/L)	61.25±4.27	60.37±5.08	57.75±6.47	57.89±5.6	59.09±5.5
ALT (IU/L)	19.05±1.56	20.19±1.81	20.28±1.32	19.98±1.65	20.06±1.82
Cholesterol (mg/dL)	147.46±13.19	150.71±5.19	147.9±12.39	150.61±5.04	150.22±9.92
TG (mg/dL)	66.71±5.69	66.62±3.4	67.44±4.79	65.47±5.71	66.74±6.61
Glucose (mg/L)	5.07±0.3	4.97±0.26	4.94±0.45	5.15±0.33	5.02±0.4
Creatinine (mg/dL)	0.39±0.05	0.39±0.06	0.38±0.05	0.41±0.02	0.38±0.04
BUN (mg/dL)	17.09±1.16	17.5±1.64	16.22±1.54	16.33±1.3	16.89±1.46

There were no significant differences among normal, control, Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups.

SD: Sprague-Dawley, Normal: Normal SD rats group injected with normal saline at left knee joint and administrated orally distilled water, Control: MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally distilled water, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally indomethacin 2 mg/kg, DGHT(L): MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 1280 mg/kg of *Daeganghwal-tang*, DGHT(H): MIA-induced osteoarthritis SD rats group administrated orally 2560 mg/kg of *Daeganghwal-tang*, ALP: Alkaline Phosphatase, AST: Aspartate Aminotransferase, ALT: Alanine Aminotransferase, TG: Triglycerides, BUN: Blood Urea Nitrogen

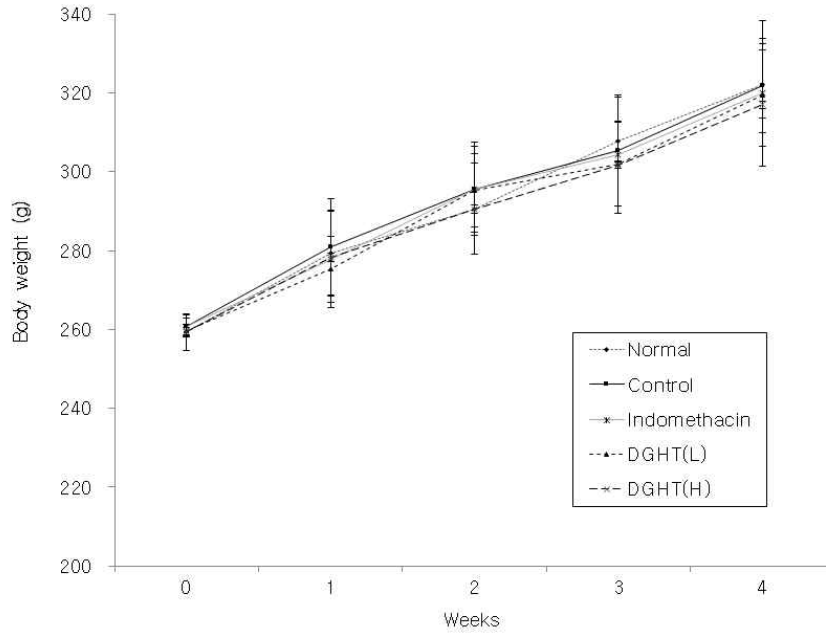


Fig. 1. The body weight changes of SD rats for 4 weeks

During the experiment period of 4 weeks, the weight of SD rats gradually increased in all groups. There were no significant differences among normal, control, Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups.

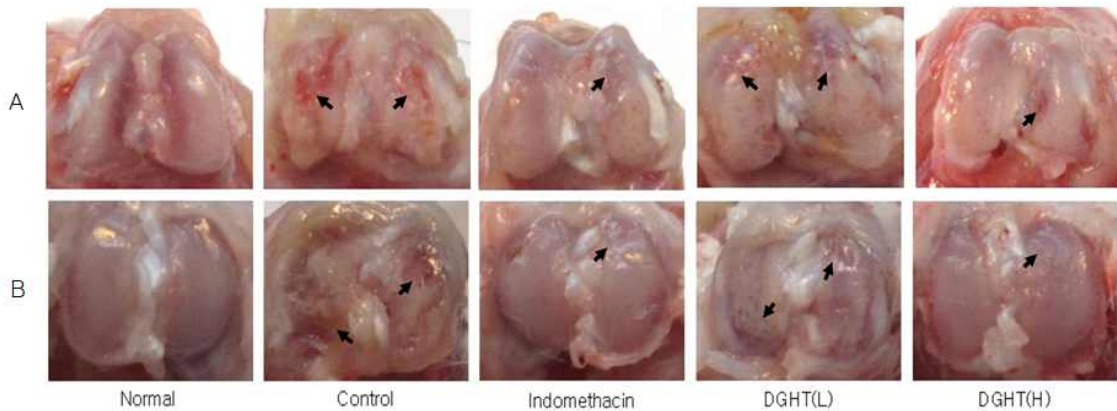


Fig. 2. The comparisons of gross appearance of the distal end of femur(A) and the proximal end of tibia(B)

In the normal group, joint surface in the distal end of femur and the proximal end of tibia was normal. In contrast, in the control group, the distal end of femur and the proximal end of tibia showed rough joint surface and osteophyte formation(block arrow). In the Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups, change of joint surface was observed, but the damage to the joint surface of the distal end of femur and the proximal end of tibia was less than that of the control group.



Fig. 3. The histological analysis of articular cartilage with H&E staining

In the normal group, articular cartilage was normal. In contrast, compared to the normal group, cartilage thickness decreased in the control group due to focal cartilage defect of articular surfaces. In the Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups, articular surface degeneration was observed, but the damage to the articular cartilage was less than that of the control group.

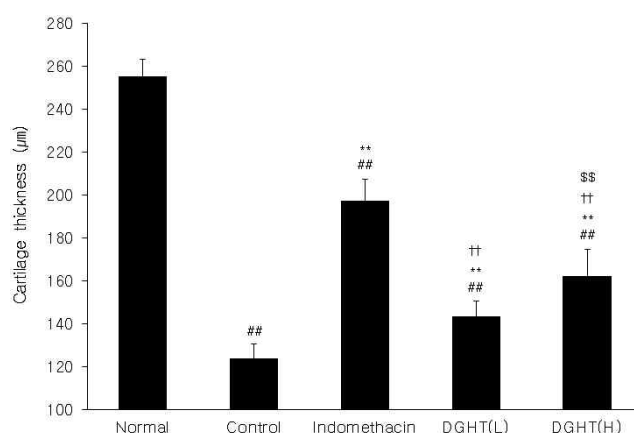


Fig. 4. The quantitative assessment of cartilage thickness

In the control group, cartilage thickness significantly decreased in comparison to the normal group. In the Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups, the decrease in the cartilage thickness was significantly less than that of the control group. In DGHT(L) and DGHT(H) groups, the cartilage thickness significantly decreased more than that of the Indomethacin group. The cartilage thickness in the DGHT(H) group significantly increased more than that of the DGHT(L) group.

$p < 0.01$ compared with Normal group by Student's t -test

** $p < 0.01$ compared with Control group by Student's t -test

†† $p < 0.01$ compared with Indomethacin group by Student's t -test

\$\$ $p < 0.01$ compared with DGHT(L) group by Student's t -test



Fig. 5. The histological analysis of articular cartilage with safranin O staining

In the normal group, proteoglycan was stained red by safranin O in proliferation zone of cartilage. In the control group, only the remaining proliferation zone of cartilage among the surfaces in which osteoarthritis was induced by MIA was stained red by safranin O. In the Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups, red area by safranin O was more than that of the control group.

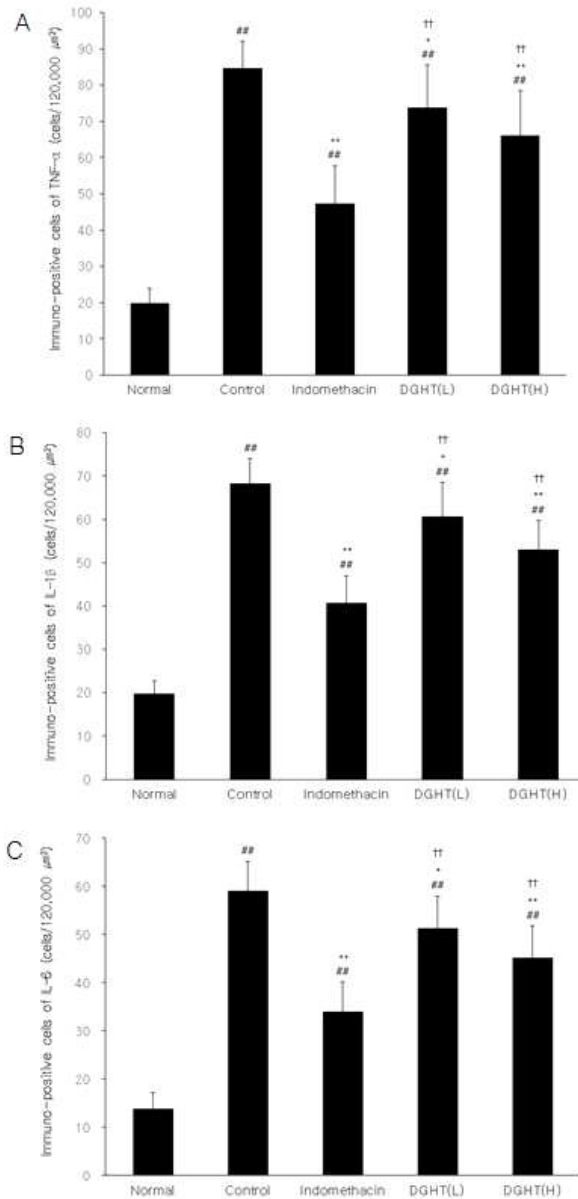


Fig. 6. The quantitative assessment of immunohistochemical expression on pro-inflammatory cytokine (A: TNF- α , B: IL-1 β , C: IL-6)

The expression level of pro-inflammatory cytokine significantly increased in the control group compared to the normal group. The Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups showed significantly down-regulated pro-inflammatory cytokine expression in the cartilage cell of MIA-induced osteoarthritis SD rats compared to the control group. In the DGHT(L) and DGHT(H) groups, the expression of pro-inflammatory cytokine significantly increased more than that of the Indomethacin group. There were no statistically significant differences between DGHT(L) group and DGHT(H) group.

^{##} $p < 0.01$ compared with Normal group by Student's t -test

^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ compared with Control group by Student's t -test

^{††} $p < 0.01$ compared with Indomethacin group by Student's t -test

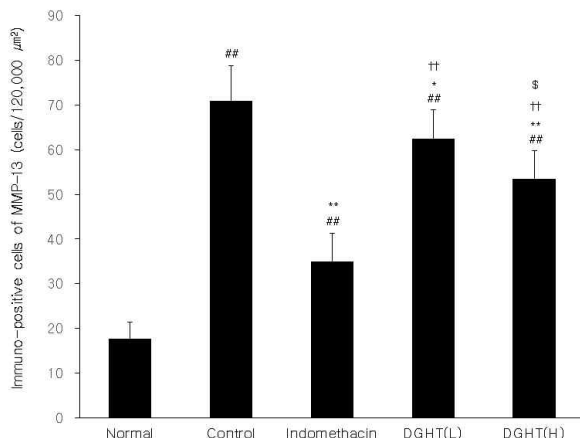


Fig. 7. The quantitative assessment of immunohistochemical expression on bone degrade factor (MMP-13)

The expression level of MMP-13 significantly increased in the control group compared to the normal group. The Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups showed significantly down-regulated MMP-13 expression in the cartilage cell of MIA-induced osteoarthritis SD rats compared to the control group. In the DGHT(L) and DGHT(H) groups, the expression of MMP-13 significantly increased more than that of the Indomethacin group. The expression of MMP-13 in the DGHT(H) group significantly decreased more than that of the DGHT(L) group.

$p < 0.01$ compared with Normal group by Student's t -test

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with Control group by Student's t -test

†† $p < 0.01$ compared with Indomethacin group by Student's t -test

\$ $p < 0.05$ compared with DGHT(L) group by Student's t -test

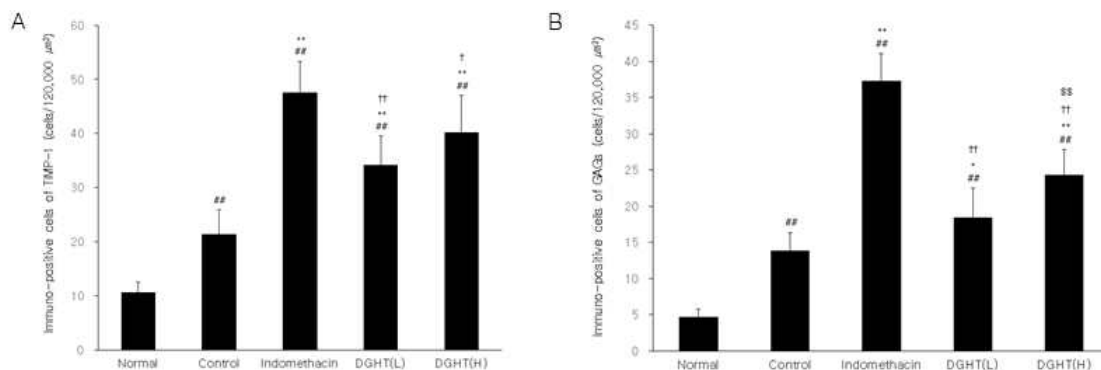


Fig. 8. The quantitative assessment of immunohistochemical expression on bone defence factors (A: TIMP-1, B: GAGs)

The expression level of bone defence factors significantly increased in the control group compared to the normal group. The Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups showed significantly up-regulated bone defence factors expression in the cartilage cell of MIA-induced osteoarthritis SD rats compared to the control group. In the DGHT(L) and DGHT(H) groups, the expression of bone defence factors significantly decreased more than that of the Indomethacin group. In the expression of TIMP-1, there were no statistically significant differences between DGHT(L) group and DGHT(H) group. However, the expression of GAGs in the DGHT(H) group significantly increased more than that of the DGHT(L) group.

$p < 0.01$ compared with Normal group by Student's t -test

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with Control group by Student's t -test

† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ compared with Indomethacin group by Student's t -test

\$\$ $p < 0.01$ compared with DGHT(L) group by Student's t -test

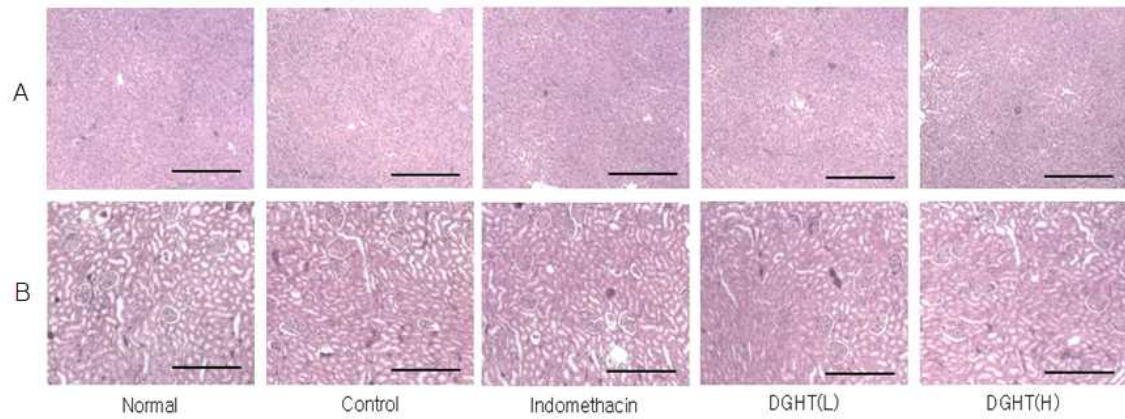


Fig. 9. The H&E stained liver(A) and kidney(B) tissues from SD rats

There were no abnormal findings in liver and kidney tissues in all groups. In addition, there were no differences among the normal, control, Indomethacin, DGHT(L) and DGHT(H) groups.