Original Article

증미오비탕이 Monosodium Iodoacetate 유발 관절연골손상에 미치는 영향

현재철, 정수현*

세명대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of *Jeungmiobi-tang* on the Articular Cartilage Injuries Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats

Jae-Cheol Hyun K.M.D., Su-Hyeon Jeong K.M.D.

Department of Rehabilitation medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Se-Myung University

Objectives: This study was carried out to investigate the protective effects of *Jeungmiobi-tang* on the articular cartilage injuries induced by monosodium iodoacetate in rats.

Methods: Twenty four rats were divided into three groups. Rats of normal group (n=8) were injected with 0.1 ml physiological saline into both knee joint cavities. In the rats of control group (n=8) and *Jeungmiobi-tang* group (n=8), Arthritis was induced by injecting with 0.1 ml monosodium iodoacetate (5 mg/ml) into both knee joint cavities. After the experiment, Gross and histopathological examinations on the knee joint were performed. The content of proteoglycan in articular cartilage and TNF- α and IL-1 β in synovial fluid were also analyzed.

Results: Grossly, Injuries to the articular cartilage surface was observed weak in the *Jeungmiobi-tang* group compared to the control group. Proteoglycan content in the articular cartilage was significantly higher in the *Jeungmiobi-tang* group than in the control group. The chondrocyte score was significantly lower in the *Jeungmiobi-tang* group than in the control group.

Conclusion: According to these results, that *Jeungmiobi-tang* has protective effects on the articular cartilage injuries induced by monosodium iodoacetate in rats.

Key Words : *Jeungmiobi-tang*, Monosodium iodoacetate, Articular cartilage injury, Proteoglycan, Osteoarthritis

서론

골관절염(osteoarthritis)은 국소관절에 점진적으로 관절연골이 소실되고 그와 관련되어 2차적 변화와 임상증상을 나타내는 질환이며 퇴행성 관절질환으로도 불린다¹⁾. 골관절염은 관절을 보호하는 연골의 손

상, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과다 골형성, 관절의 변형 등의 특징이 나타나며 관절통, 압통, 경직, 잠김, 부종 등의 증상이 동반된다²⁾.

골관절염의 위험 요인으로는 연령, 관절의 과도한 사용, 반복적인 외상, 비만, 유전 등이 있으며³⁻⁴⁾ 그 중에서도 노화는 많은 연구에서 나이에 비례해 골관

• Received : 31 July 2020

• Revised : 13 August 2020

• Accepted : 19 August 2020

• Correspondence to : Su-Hyeon Jeong

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Se-Myung University, 63, Sangbang 4-gil, Chungju-si, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea

Tel : +82-43-841-1737, Fax : +82-43-856-1731, E-mail : js365a@hanmail.net

절염이 증가하는 것으로 보고되었다⁵⁾. 한국은 지난 2000년에 65세 이상 인구의 비중이 7%를 넘어섰고 2018년에 65세 이상 인구의 비중이 14.46%를 기록하며 고령사회에 진입함에 따라⁶⁾ 골관절염 환자도 점차 증가할 것으로 생각되며 이에 따라 다양한 치료법이 연구되어야 할 것이다.

한의학에서 골관절염은 痺症, 歷節風 痛風 등에 해당하며 風寒濕熱의 邪氣가 관절에 응체됨으로써 筋骨, 肌肉, 關節에 屈伸不利, 癱木, 重着, 疼痛 및 관절의 강직과 변형을 초래한다고 하였으며 치료는 침구, 약물, 운동, 주사 요법 등의 보존적 치료와 충분한 보존적 치료에도 효과를 보지 못하거나 기능장애가 심할 경우 수술적 치료를 고려한다²⁾.

증미오비탕은(增味五痺湯)은 《東醫寶鑑》에 ‘治風寒濕合爲痺, 肌體癱痺不仁’이라 하여 風·寒·濕邪로 痺症이 생겨 肌肉이 마비되고 감각이 없는 것을 치료한다 하였고 五痺, 즉 筋痺, 骨痺, 脈痺, 皮痺, 肌痺로 근맥이 오그라들고 관절이 아파 잘 걷지 못하거나 뼈마디가 무거워지면서 시큰거리고 아픈 증상을 보이는 痺症의 치료에 사용할 수 있다고 하였다⁷⁾. 증미오비탕의 구성성분인 羌活⁸⁾, 薑黃⁹⁾, 白朮¹⁰⁾, 海桐皮¹¹⁾, 當歸¹²⁾, 白芍藥¹³⁾, 生薑¹⁴⁾은 항염증, 항산화, 진통 등의 효과가 보고되었고 따라서 이러한 약재들로 구성된 증미오비탕은 골관절염에 유효할 것으로 기대된다.

기존에 Monosodium iodoacetate(MIA)를 이용해 골관절염을 유발한 흰 쥐에 진무탕¹⁵⁾, 대영전¹⁶⁾, 방기음¹⁷⁾, 이묘환¹⁸⁾ 등의 연구가 진행되었지만 증미오비탕에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 MIA 유발 골관절염 모델을 정상군, 대조군, 증미오비탕군으로 나누어 관절연골의 육안적 검사, 관절연골내 proteoglycan(PG) 함량 측정, 백혈구 수 계산, 슬관절의 병리조직학적 검사, 슬관절 활액내 IL-1 β 와 TNF- α 함유량 측정을 통해 증미오비탕의 관절연골 손상 억제 효과를 확인하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

7주령의 수컷 Sprague-Dawley rat(나라바이오텍, 한국)을 들여와 1주일간 세명대학교 동물 사육실 환경(습도 55 $\pm$ 5 %, 온도 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 12시간 명암 주기)에 적응시킨 후, 체중 220g 내외의 개체를 선별해 실험을 시작하였다. 실험 중 사료와 음수는 충분히 제공하였다.

본 실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실시하였다(승인번호 smecae-130604).

2. 관절연골의 손상 유발

관절연골손상의 유발은 Janusz 등¹⁹⁾의 방법에 준하였다. MIA 용액은 MIA를 멸균 생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 용해하여 제작하였다. 실험시작일에 ether로 실험쥐를 마취시키고 양측 슬관절 주변을 소독한 뒤, 양측 슬관절강내에 MIA 용액 0.1 ml를 각각 주입하여 관절연골손상을 일으켰다.

3. 실험군의 분류

흰쥐를 일주일간 실험실환경에 적응시킨 후 각 군당 체중이 고르게 8마리씩 배정하였으며, 아래와 같이 군을 배정하고 처치하였다.

정상군(Noraml Group)에는 실험 시작 날 멸균 생리식염수를 양 쪽 슬관절강내에 각각 0.1 ml씩 1회 주사하고 그 후 20일간 하루에 한번 씩 증류수 1 ml를 경구투여 하였다.

대조군(Control Group)에는 실험 시작 날 MIA 용액을 양 쪽 슬관절강내에 각각 0.1 ml씩 주사하고 그 후 20일간 하루에 한번 씩 증류수 1 ml를 경구투여 하였다.

증미오비탕군(Jeungmiobi-tang Group)에는 실험 시작 날 MIA 용액을 양 쪽 슬관절강내에 각각 0.1 ml씩 주사하고 그 후 20일간 하루에 한번 씩 증미오비탕 농축액 1 ml를 경구투여 하였다.

4. 검액의 제조

증미오비탕의 약재 구성은 《東醫寶鑑》⁷⁾에 준하였으며, 약재는 세명대학교 충주한방병원에서 구입하였다. 처방의 구성과 약재별 용량은 Table 1과 같다.

증미오비탕 4첩 분량 (244g)을 2,000 mL의 증류수에 2시간 담가두고, 열탕기(TOPS, MS-IM607, 한국)로 100 °C에서 2시간 30분 전탕하여 만들어진 전탕액을 원심하여 침전물을 제거했고 감압농축기를 써서 100 mL로 농축했다.

Table 1. Prescription of Jeungmiobi-tang per Pack

Name of herbs	Pharmacognostic name	Weight(g)
羌活	<i>Ostericum Koreanum</i>	4g
防己	<i>Sinomenium Acutum</i>	4g
薑黃	<i>Curcuma Longa Rhizoma</i>	4g
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	4g
海桐皮	<i>Kalopanax Cortex</i>	4g
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4g
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4g
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3g
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	30g
Total		

5. 검사 항목 및 방법

1) 표본 처리

20일간의 실험 마지막 날에 모든 개체를 ether로 마취시켜 심장채혈한 후 3 mL는 EDTA-2K tube에 담아 백혈구 수를 측정하였고 나머지 혈액은 혈청분리관에 담아서 원심을 통해 혈청을 분리했다.

심장채혈 직후에 오른쪽 고관절 및 족근관절 부위를 절단하여 슬관절을 적출했다. 적출된 슬관절강내에 동일한 개체에서 분리한 혈청 0.2 mL를 주사하여 세정 후 슬관절강을 노출시켜 원심관으로 10분간 3,000 rpm에서 원심하여 세정된 활액을 채취했다. 채취한 세정된 활액은 10분간 8,000 rpm에서 원심하여 침전된 불순물을 제거하고 상층액을 채취하여 검사전까지 -70 °C에서 보관했다. 활액을 분리한 후

오른쪽 슬관절을 10% 중성포르마린액에 24시간 동안 고정하고 경골을 분리했다. 분리된 경골은 관절연골의 육안 관찰과 Safranin O 염색에 사용했다.

동일한 방법으로 적출된 왼쪽 슬관절을 10% 중성포르마린액에 24시간 고정한 뒤 병리학적인 관찰에 사용했다.

2) 체중 측정

모든 개체의 체중은 실험개시일을 포함하여 5일마다 측정했다.

3) 관절연골의 육안적 관찰

고정된 오른쪽 경골 근위단 관절연골 주변을 깔끔히 한 후 사진을 촬영하여 육안적으로 관절연골표면을 관찰했다.

4) 관절연골내 proteoglycan(PG) 함유율 측정

20% 개미산 용액에 육안적 관찰에 사용한 경골 근위단을 담가서 4일간 교반 및 탈회시키고 정중 관상단면을 만들어 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 5 µm 두께의 박절편을 제작했다.

경골 근위단 관절연골내의 PG 함유량을 평가하기 위해 박절편 표본을 Safranin O 염색을 실시하였다. 저배율에서 관절연골이 모두 보이도록 조직을 촬영 후 칼라영상분석기를 사용하여 관절연골의 투과도를 측정하였다. 정상군에서 측정된 투과도 평균을 100%로 설정하였고, 대조군 및 증미오비탕군의 투과도를 환산하여 PG 함유율을 측정했다.

5) 혈액학적 검사

EDTA-2K tube에 담긴 채혈된 혈액을 검사에 사용하였다. 자동혈구계산기를 이용해 총백혈구, 호중구, 단핵구 및 림프구 수를 측정하였다.

6) 병리조직학적 관찰 및 골관절염 지수 평가

각 개체의 왼쪽 슬관절을 20% 개미산 용액에 담

아 4일간 교반 및 탈회시켰다. 대퇴골과 경골의 관절면, 그리고 슬관절낭이 포함된 슬관절의 시상단면을 만들고 조직처리과정을 거친 후 파라핀으로 포매해 5 μ m 두께의 슬관절 박절편을 제작했다.

슬관절 박절편을 H&E 염색한 뒤 광학현미경으로 슬관절 구조의 병리조직학적인 변화를 관찰하였고, 골관절염 지수는 활막, 관절연골, 연골하골조직에서 보이는 병리조직학적 병변을 Rudolphi 등²⁰⁾의 방법 (Table 2)으로 점수화하였다.

Table 2. Criteria for Histopathological Score of Osteoarthritic Lesions

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

7) 활액세정액의 interleukin-1 β (IL-1 β) 함량 산출
IL-1 β 함량은 Rat IL-1 β ELISA kit(Endogen, USA)로 측정하였다. biotinylated antibody reagent와 streptavidin-HRP solution은 30분, 표준액과 검액은 2시간 반응시켰다. 각 단계사이에 washing buffer로 5회씩 세척하였고 끝으로 TMB substrate solution을 30분 동안 반응시켜 발색시키고 stop solution으로 반응을 정지시킨 뒤 ELISA reader (Molecular Devices, E10514, USA)를 이용해 450nm의 파장에서 흡광도를 측정했다.

7 단계의 IL-1 β 표준액(2500, 1000, 400, 160, 64, 25.6, 0 pg/ml)에서 측정된 흡광도로 아래와 같은 직선회귀방정식을 구하고, 방정식을 통해 IL-1 β 의 함량을 산출하였다.

$$IL-1\beta \text{ 함량} = (1729.9 \times \text{검액의 흡광도}) + 29.3$$

8) 활액세정액의 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 함량 산출

TNF- α 함량은 Rat TNF- α ELISA kit(Endogen, USA)로 측정하였다. streptavidin-HRP solution은 30분, 표준액과 검액은 1시간, 그리고 biotinylated antibody reagent는 2시간 동안 반응시켰다. 각 단계사이에 washing buffer로 4회씩 세척하였으며 끝으로 TMB substrate solution을 30분 동안 반응시켜 발색시키고 stop solution으로 반응을 정지시킨 뒤 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)를 이용해 450nm에서 흡광도를 측정했다.

6 단계의 TNF- α 표준액(2500, 833, 278, 93, 31, 0 pg/ml)에서 측정된 흡광도로 아래와 같은 직선회귀방정식을 구하고, 방정식을 통해 TNF- α 의 함량을 산출하였다.

$$TNF-\alpha \text{ 함량} = (2331.6 \times \text{검액의 흡광도}) - 3.96$$

6. 통계처리

측정 항목 결과에 대한 유의성은 SPSS(SPSS 10.1 for Windows, USA)를 이용해 student's t-test로 검증하였다. 모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, $p < 0.05$ 에서 유의수준을 검증하였다.

결 과

1. 체중의 차이

정상군은 체중이 실험기간 동안 꾸준히 증가하여 20일간 52.9%의 체중 증가율을 보였다. 대조군은 MIA 접종 후 5일째부터 체중이 정상군에 비해서 다소 낮았으나 유의성은 없었고 20일간의 체중증가율은 46.6%로 정상군과 비교하여 유의성 있게 낮았다.

증미오비탕군의 체중은 MIA 접종 후 10일째부

터 대조군에 비해 다소 높았으나 유의성은 없었으며 20일간의 체중증가율은 48.9%로 대조군에 비해 높았으나 유의성은 없었다(Table 3).

2. 관절연골의 육안 소견

정상군 슬관절 경골 근위단의 관절연골 표면은 윤택이 있으며 부드럽고 매끄러운 상태로 관찰되었다(Fig. 1). 대조군은 모든 경우에서 경골 근위단의 관절연골 표면의 윤택이 소실되었고 표면이 부드럽지 않고 거칠었으며, 부위에 따라서 연골표면이 소실된 경우도 있었다(Fig. 2).

증미오비탕군의 모든 예에서도 연골의 윤택이 사라지고 표면이 거칠게 보였으나, 대조군에 비해서는 그 정도가 완화되어 있었다(Fig. 3).

3. 관절연골내 PG 함유율 차이

정상군의 관절연골은 safranin O에 강하게 반응하여 짙은 붉은색으로 염색되었다(Fig. 4). 대조군에서는 연골층의 대부분에서 safranin O에 반응하지 않아 염색되지 않았으며, 연골층 주변부와 연골하조직의 연골에서 일부만 미약하게 염색되었다(Fig. 5). 증미오비탕군은 대조군에 비해서 관절연골의 염색반응이 진하면서 넓게 관찰되었다(Fig. 6).

칼라영상분석기를 이용해 관절연골에서의 투과도를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해서 유의성

Fig. 1. Picture of proximal tibia of normal group. The articular cartilage surfaces of tibia are glossy and smooth.

Fig. 2. Picture of proximal tibia of control group. The articular cartilage surfaces of tibia are discolored and rough (arrow head), and some areas are deeply ulcerated (arrow).

Fig. 3. Picture of proximal tibia of *Jeungmiobi-tang* treated group. The articular cartilage surfaces of tibias are less discolored and less rough than control group.

Table 3. Effects of *Jeungmiobi-tang* Treatment on the Body Weight of Rats

Group	Body Weight(g)					Increased Ratio of Body Weight(%)
	0	5	10	15	20 days	
Normal (n=8) [†]	220±6*	255±11	288±13	314±15	337±16	52.9±5.6
Control (n=8) [‡]	221±6	246±11	280±14	303±13	324±10	46.6±4.0
Jeungmiobitang (n=8) [§]	221±9	244±8	282±12	307±13	329±18	48.9±6.0

* : data expressed as Mean±S.D.

† : saline injected and treated with distilled water

‡ : MIA injected and treated with distilled water

§ : MIA injected and treated with Jeungmiobi-tang extracts

|| : Statistically significant compared with normal group(p<0.05)

Fig. 4. Coronal section of proximal tibia of normal group. The articular cartilage(*) is thickly stained with Safranin O. EP : epiphyseal plate, Safranin O stain, bar = 300 μ m.

Fig. 6. Coronal section of proximal tibia of *Jeungmiobi-tang* treated group. The articular cartilage(*) is more stained with Safranin O than control group (arrow and arrow heads). EP : epiphyseal plate. Safranin O stain, bar = 300 μ m.

Fig. 5. Coronal section of proximal tibia of control group. The red color disappeared in a great part of articular cartilage (*). Only a portion of the periphery of cartilage and subchondral part was stained red color (arrow and arrow heads). EP : epiphyseal plate. Safranin O stain, bar = 300 μ m.

Table 4. Effects of *Jeungmiobi-tang* Treatment on the Proteoglycan Content in Tibial Articular Cartilages

Group	Proteoglycan Content (%)
Normal (n=8) [†]	100.0 $\pm$ 8.3 [*]
Control (n=8) [‡]	19.5 $\pm$ 5.6 [‡]
Jeungmiobitang (n=8) [§]	34.7 $\pm$ 17.7 [¶]

* : data expressed as Mean $\pm$ S.D.

[†] : saline injected and treated with distilled water

[‡] : MIA injected and treated with distilled water

[§] : MIA injected and treated with Jeungmiobitang extracts

[‡] : Statistically significant compared with normal group (p<0.001)

[¶] : Statistically significant compared with control group (p<0.05)

있게 PG 함유량이 낮았으며, 증미오비탕군은 대조군에 비해서 유의성 있게 PG 함유량이 높았다 (Table 4).

4. 총백혈구, 호중구, 단핵구, 림프구 수의 차이
대조군은 총백혈구 및 호중구 수에서 정상군에 비

Fig. 7. Sagittal section of normal group's knee joint. The articular cartilages(*) of synovial membrane(arrows), meniscus(M), femur(F), tibia(T), and are normal. H&E stain, bar = 300 μ m.

Fig. 8. Sagittal section of control group's knee joint. A great part of articular cartilages(*) of tibia(T) and femur(F) are necrotic and degenerated. There is Cleft(arrow head) in deep part of articular cartilage. Also, reactive fibrosis(arrows) are shown. H&E stain, bar = 300 μ m.

해 유의성 있게 높았고, 림프구 및 단핵구 수는 정상 군에 비해서 높았으나 유의성은 없었다.

증미오비탕군의 총백혈구, 호중구, 단핵구, 림프구 수는 대조군에 비해 높았으나 유의성은 없었다(Table 5).

5. 슬관절의 병리조직학적 소견

실험 20일이 경과된 정상군의 슬관절을 구성하는 대퇴골, 경골, 관절반월판 및 활막은 모든 예에서 정상범위의 소견이 보였다(Fig 7).

실험 20일이 경과된 대조군 슬관절의 기본 병리조직학적 소견은 관절연골이 변성, 괴사, 탈락된 것이

보였고 연골하 골조직의 손상 및 반응성 재구축이 나타났다(Fig. 8). 활막에서의 염증성 또는 증식성 변화는 없었다. 슬관절을 구성하는 대부분의 연골은 변성 및 괴사되어 윤곽이 사라졌으며, 연골세포도 대부분 보이지 않았다. 연골 심층의 균열이 많은 부위에서 진행되었고 경우에 따라 연골층의 탈락으로 연골하 골조직이 노출되어 있었다. 또한 연골하 골조직의 괴사, 섬유화 및 파골세포의 활성이 대조군의 모든 예에서 관찰되었다(Fig. 9).

증미오비탕군에서도 슬관절의 병리조직학적 소견은 대조군과 비슷하게 관찰되었다. 하지만 대조군에

Table 5. Difference in Numbers of Total WBC, Neutrophils, Lymphocytes and Monocytes

Group	Total WBC (x103/ μ l)	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes
Normal (n=8) [†]	4.08 $\pm$ 0.53*	881 $\pm$ 174	3,087 $\pm$ 419	69 $\pm$ 28
Control (n=8) [‡]	5.27 $\pm$ 1.20	1,175 $\pm$ 285*	3,865 $\pm$ 1001	104 $\pm$ 53
<i>Jeungmiobi-tang</i> (n=8) [§]	6.35 $\pm$ 1.17	1,330 $\pm$ 223	4,763 $\pm$ 892	187 $\pm$ 100

* : data expressed as Mean $\pm$ S.D.

[†] : saline injected and treated with distilled water

[‡] : MIA injected and treated with distilled water

[§] : MIA injected and treated with Jeungmiobitang extracts

^{||} : Statistically significant compared with normal group(p<0.05)

Fig. 9. Higher magnification of Fig. 8. Clefts (arrow heads) and Homogenous degeneration (*) of articular cartilage are shown. Also, There are reactive fibrosis (long arrows) and activation of osteoclasts (small arrows). H&E stain, bar = 100 μ m.

Fig. 10. Sagittal section of Jeungmiobi-tang treated group's knee joint. A great part of articular cartilages (*) of tibia (T) and femur (F) are degenerated. But chondrocytes (arrows) around the degenerative area are intact. Clefts in deep part of articular cartilage are not shown. H&E stain, bar = 300 μ m.

비해 관절연골의 변성과 괴사가 미약하게 관찰되었다. 또한 대부분의 예에서 연골 심층에서의 균열은 보이지 않았고 변성 및 괴사된 관절연골 주변에는 많은 수의 연골세포가 증식되어 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 10).

6. 골관절염 지수의 차이

연골세포손상점수(chondrocyte score)는 증미오비탕군이 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다. 연골기질 손상점수(matrix score) 및 골관절염지수 합계는 증미오비탕군이 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다. 반면 연골하골조직손상점수(subchondral bone score)는 증미오비탕군이 대조군에 비해 다소 높았으나 유의성은 없었다 (Table 6).

7. 활액세정액의 interleukin-1 β (IL-1 β) 함량 차이

IL-1 β 함량은 대조군은 114.7 $\pm$ 13.3로 나왔고 정상군은 96.3 $\pm$ 13.1로 나와 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 높았다. 증미오비탕군의 활액세정액의 IL-1 β 함량은 102.6 $\pm$ 8.0로 대조군에 비해 낮았으나

유의성은 없었다 (Table 8).

8. 활액세정액의 tumor necrosis factor - α (TNF- α) 함량 차이

TNF- α 함량은 대조군이 101.5 $\pm$ 16.5로 정상군 48.2 $\pm$ 13.3에 비해서 유의성 있게 높았다. 증미오비탕군의 활액세정액의 TNF- α 함량은 84.0 $\pm$ 18.9로 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다 (Table 7).

고 찰

골관절염은 연골의 파괴와 소실, 연골세포 수의 감소, 활액막의 염증반응, 연골하골의 반응성 과증식과 재배열 등으로 인해 국소 관절의 통증, 야간통, 30분 이내의 조조강직, 관절 운동시의 마찰음, 관절 운동 범위 제한, 관절 주변 근육의 약화 등의 증상을 나타낸다¹⁾. 골관절염의 진행은 연골세포의 수와 형태의 변화로 인해 제 2형 콜라겐 (Type II collagen), 프로테오글리칸 (Proteoglycan, PG) 등의 세포외기질 생산이 줄어들고 세포외기질 분해가 촉진되면서 연골의 기본적인 구조가 무너져 관절의 부하를 견디지

Table 7. Effects of *Jeungmiobi-tang* Treatment on Tumor Necrosis Factor- α Contents in Synovial Fluids of Rats

Group	Tumor Necrosis Factor- α (pg/ml)
Normal (n=8) [†]	48.2 $\pm$ 13.3*
Control (n=8) [‡]	101.5 $\pm$ 16.5 [‡]
Jeungmiobi-tang (n=8) [§]	84.0 $\pm$ 18.9

* : data expressed as Mean $\pm$ S.D.

† : saline injected and treated with distilled water

‡ : MIA injected and treated with distilled water

§ : MIA injected and treated with Jeungmiobi-tang extracts

‡ : Statistically significant compared with normal group(p<0.001)

Table 8. Effects of *Jeungmiobi-tang* Treatment on Interleukin-1 β Contents in Synovial Fluids of Rats

Group	Interleukin-1 β (pg/ml)
Normal (n=8) [†]	96.3 $\pm$ 13.1*
Control (n=8) [‡]	114.7 $\pm$ 13.3 [‡]
Jeungmiobi-tang (n=8) [§]	102.6 $\pm$ 8.0

* : data expressed as Mean $\pm$ S.D.

† : saline injected and treated with distilled water

‡ : MIA injected and treated with distilled water

§ : MIA injected and treated with Jeungmiobi-tang extracts

‡ : Statistically significant compared with normal group(p<0.05)

못하여 발생하게 되며 연골이 파괴되는 과정에 interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β 등의 cytokine이 중요한 역할을 맡는다²¹⁾.

골관절염은 성별과 연령에 따라 유병률 차이가 큰

질환으로 연령이 증가할수록 유병률도 증가하며, 이로 인해 골관절염 노인 환자도 증가하여 노인의료비 증대의 큰 원인이 되고 있다²²⁾. 결과적으로 골관절염은 국가의 사회적, 경제적 큰 손실을 일으키는 문제로 대두되고 있다²³⁻²⁴⁾. 따라서 골관절염 치료에 관한

Table 6. Effects of *Jeungmiobi-tang* Treatment on the Osteoarthritic Score of the Knee Joints of Rats

Group and Identification Number		Matrix Score	Chondrocyte Score	Subchondral Bone Score	Sum of Scores
Control [†]	C1	6	5	8	19
	C2	3	5	3	11
	C3	8	5	8	21
	C4	3	5	3	11
	C5	3	5	3	11
	C6	6	5	8	19
	C7	8	8	3	19
	C8	6	5	3	14
	Mean	5.4 $\pm$ 2.0*	5.4 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 2.4	15.6 $\pm$ 4.0
<i>Jeungmiobi-tang</i> [‡]	T1	1	2	3	6
	T2	3	5	3	11
	T3	3	5	8	19
	T4	3	2	8	13
	T5	6	5	8	19
	T6	1	2	0	3
	T7	3	2	8	13
	T8	6	5	3	14
	Mean	3.3 $\pm$ 1.8	3.5 $\pm$ 1.5 [§]	5.1 $\pm$ 3.0	12.3 $\pm$ 5.3

* : data expressed as Mean $\pm$ S.D.

† : MIA injected and treated with distilled water

‡ : MIA injected and treated with Jeungmiobi-tang extracts

§ : Statistically significant compared with control group(p<0.05)

연구가 더욱 더 이루어져야 할 것으로 보인다.

본 연구에서 관절연골의 육안적 소견으로는 정상 군에 비해 대조군과 증미오비탕군 모두 경골 근위단의 관절연골 표면의 윤택감이 소실되었고 표면이 거칠었다. 대조군은 부위에 따라서는 연골표면이 소실되기까지 하였으나 증미오비탕군에서는 표면이 소실된 예는 없었으며 거친 정도도 대조군에 비해 완화되어 있었다. 이는 증미오비탕의 투여가 관절연골의 손상을 억제한 것으로 보인다.

프로테오글리칸(PG)은 collagen과 함께 관절연골의 세포외기질을 이루며 정상적인 연골세포에서 지속적으로 생산과 파괴가 이루어지며 균형을 유지하며²⁵⁾ 관절 표면에 proteoglycan membrane을 형성해 관절면을 보호하고, 삼투압을 통해 연골에 영양공급을 한다²⁶⁾. 관절염이 발생하면 PG 성분이 감소하고, 이는 연골의 연화를 유발하여 관절의 퇴행성 변화를 일으킨다²⁷⁾. 관절연골의 PG 함유율 차이에서 증미오비탕군은 대조군에 비해 연골층과 그 주변부에서 모두 넓고 강하게 염색반응이 나타났으며 칼라영상분석기를 통한 관절연골에서의 투과도 측정에서도 대조군에 비해 유의성 있게 PG 함유량이 높았다. 이를 통해 증미오비탕의 투여가 관절연골의 PG의 파괴를 억제하는 효과가 있다 볼 수 있다.

병리조직학적으로 관찰하였을 때 증미오비탕군 슬관절의 병리조직학적 병변은 대조군과 비슷하였지만 대조군에 비해서 관절연골의 변성과 괴사는 미약하게 나타났으며, 변성괴사된 관절연골주변에는 많은 수의 연골세포가 증식되어 있는 것이 보였고, 대부분의 예에서 연골 심층부의 균열은 관찰되지 않았다. 이는 증미오비탕의 투여가 관절연골의 변성, 괴사를 억제하며 연골세포의 파괴를 막아주는 효과가 있음을 보여준다.

골관절염 지수에서 연골세포손상점수는 증미오비탕군이 대조군에 비해 유의성 있게 낮았고 연골기질 손상점수 및 골관절염지수 합계는 증미오비탕군이 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다. 연골세포

손상점수에서 병리조직학적 관찰에서 나타난 연골세포의 증식 소견과 일치하는 결과를 보여줌으로서 증미오비탕의 투여가 연골세포 수의 감소를 막는 효과가 있다고 생각되나 연골기질 및 연골하골조직의 손상에 대한 억제 효과는 추후 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

염증반응은 상처와 외부 이물질의 침입 시 생체 방어를 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역(innate immunity) 반응이라고 알려져 있다²⁸⁾. 급성 감염이 있을 경우 호중구, 림프구 등의 백혈구 수가 증가할 수 있다²⁹⁾. 증미오비탕군의 총백혈구, 호중구, 단핵구, 림프구 수는 대조군에 비해 높았으나 유의성은 없었고 이는 20일의 짧은 실험 기간으로 급성 염증반응에 대한 면역 반응이 지속된 것으로 생각된다.

TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되어 IL-1, IL-6, IL-8, MMP 등의 생성을 유발하여 염증을 증폭하며³⁰⁾ PG의 재합성을 억제하고 분해를 촉진하여 연골의 손상과 골관절염의 진행을 일으킨다³¹⁾. IL-1 β 는 TNF- α 에 의해 생성되어 연골 및 활막 세포로부터 PGE2, NO 등의 염증매개체를 생산하며, MMPs의 발현을 자극해 골관절염에서 연골분해를 일으킨다^{32,33)}. 증미오비탕군의 슬관절 활액내 활액세정액의 TNF- α , IL-1 β 함량은 대조군에 비해서 낮았으나 유의성은 없었고 이는 짧은 연구 기간으로 인해 급성 염증에 대한 면역 반응이 이루어지고 있는 시기에 측정해 나타난 결과로 생각되며 유의하진 않지만 감소된 결과를 보았을 때 연구기간을 보다 길게 설정한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

이상의 결과로 증미오비탕의 투여가 흰 쥐의 MIA로 유발한 골관절염에 있어 관절연골 내 PG의 감소를 줄이고 연골세포의 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 하지만 각 군의 절대적인 수가 부족하다는 것과, 인위적으로 관절염을 급성적으로 유발하였기에 퇴행성 변화로 인한 만성적인 골관절염에 적용하기에는 무리가 있고, 연구기간이 20일로

부족했다는 한계가 있으며 이 한계점을 보완한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 보인다.

결론

증미오비탕의 관절연골손상에 미치는 영향을 확인하기 위해 MIA 유발 골관절염 모델을 정상군, 대조군, 증미오비탕군으로 나누어 투여 20일 뒤 관절연골의 육안적 검사, 관절연골내 PG 함유량 측정, 백혈구 수 계산, 슬관절의 병리조직학 검사, 슬관절 활액 내의 IL-1 β 및 TNF- α 함량 측정을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 육안적으로 관절연골표면의 손상은 증미오비탕군이 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다.
- 관절연골내 PG 함유율(%)은 대조군(19.5 $\pm$ 5.6)에 비해 증미오비탕군(34.7 $\pm$ 17.7)에서 유의하게 높았다.
- 연골세포손상점수는 증미오비탕군(3.5 $\pm$ 1.5)이 대조군(5.4 $\pm$ 1.0)에 비해서 유의하게 낮았다.

이상의 결과를 보았을 때, 증미오비탕은 MIA로 유발되는 관절연골손상을 보호하는 작용을 가지고 있다고 생각된다.

참고문헌

1. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. The 7th edition Second. Seoul : Choisin publisher. 2013:317-22.
2. Rehabilitation Medicine of Korean Medicine. Korean Rehabilitation Medicine. 4th edition. Seoul: Kunja Publishing INC. 2015:102-16.
3. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: new insights: part 1: the disease and its risk factors. Ann Intern Med. 2000;133:635-646.
4. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. BMJ 1996;312:940-3.
5. Greene MA, Loeser RF. Aging-related inflammation in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2015;23(11):1966-71.
6. Won YK. The Effect of Population Aging on the Economic Growth. Pusan national university. 2020:1.
7. Heo J. Donguibogam. Bupin publishes. 2009: 1048-50.
8. 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.
9. Kim YJ. Effects of *Curcuma longa* Rhizoma on MIA-induced Osteoarthritis in Rat Model. J Korean Med. 2019;40(3):35-58.
10. Bin CH, Song CH. Ameliorating Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on TNF- α -induced 3T3-L1 Adipocyte Dysfunction. Korean Journal of Acupuncture. 2015;32(3): 116-23.
11. Son HC, Keum DH, Lee MJ. Effects of ELV(*Erythrina variegata* L. *inne* Var. *orientalis*(L.) Merr.) on Type II Collagen-Induced Arthritis. J Oriental Rehab Med. 2003;13(1):67-76.
12. Han HS, Anti-inflammatory Effect of Angelicae Gigantis Radix Water Extract on LPS-stimulated Mouse Macrophages. Kor J Herbology. 2013;28(5):113-9.
13. Herbology editorial committee of Korean

- medicine schools. *Herbology*. Seoul:YOUNGLIMS. 2007;634-5.
14. Jung HW, Yoon CH, Park KM, Han HS, Park YK. Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma* *Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(6):1190-7.
15. Yang DH, Woo CH, An HD. Effects of Jinmu-tang on the Osteoarthritis by MIA in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2018;28(1):19-31.
16. Seo IB, Jeong SH, Park DS. Inhibitory Effects of Daeyeoungjeon on the Injury of Articular Cartilage Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2017;27(2):9-17.
17. Jung HC, Jeong SH, Seo IB. Protective Effects of Banggi-eum (FangchiYin) on the Articular Cartilage Injuries Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2014;24(3): 39-50.
18. Ahn HB, Kim SJ, Seo IB, Jeong SH. Effects of Imyo-san Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2010;20(3):13-26.
19. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, et al. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001;9:751-60.
20. Rudolphi K, Gerwin N, Verziji N, van der Kraan P, van den Berg W. Pralnacasan. an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and 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. Kim CS, Yoo KS, Hong SH. The Effects of Foot Reflexology on Arthralgia, Ankylosis, Depression, and Sleep in Community dwelling Elderly Women with Osteoarthritis. *Journal of Korean Academy of Community Health Nursing*. 2014;25(3):207-16.
23. Kim HJ. Influence of Depression on Physical Activity, Symptoms of Chronic Pain And Sleep Disorders in the Female Elderly with Knee Osteoarthritis. *Exercise Science*. 2017; 28(2):191-7.
24. Grazio S. Osteoarthritis-epidemiology. economics and quality of life. *Reumatizam*. 2005;52(2): 21-9.
25. 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.
26. Mary KC, Shawn OF, Kwok HS, Kim JW, Kim HG, Jung HS, Tae GS translation. *Biochemistry*. 5th ed. Seoul:Life Science Publisher. 2007:451.
27. Frank H. Netter MD. *The CIBA collection of medical illustrations*. Seoul:Jeongdam. 2000:178.
28. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS,

- Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):227-35.
29. Park SK. An interpretation on abnormal finding of CBC. *The Korean Journal of Medicine*. 2010;78(5):531-9.
30. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-74.
31. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Crucial Role of the Interleukin-6/interleukin-17 Cytokine Axis in the Induction of Arthritis by Glucose-6-phosphate Isomerase. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):754-63.
32. Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, Polanska M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007;38(3):151-6.
33. Legrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically upregulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):2078-83.

ORCID

현재철 <https://orcid.org/0000-0003-1235-1855>
정수현 <https://orcid.org/0000-0003-2976-6424>