

附子瀉心湯이 산화적 손상, 염증 및 골관절염 병태모델에 미치는 영향

우창훈 · 오민석*

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학교실, 대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실*

Effects of *Bujasim-tang* Ethanol Extract on Oxidative Stress, Inflammation and Osteoarthritic Rat Model

Chang-Hoon Woo, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.*

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University,
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dae-Jeon University*

Objectives This study was performed to investigate the effects of *Bujasim-tang* ethanol extract (BST) on oxidative stress, inflammation and osteoarthritic rat model.

Methods To ensure safety of BST, heavy metal levels were measured and cytotoxicity test was done. *In vitro*, To evaluate antioxidative effects of BST, total phenolic contents, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) scavenging activity, reactive oxygen species (ROS) levels were measured. Also, to evaluate anti-inflammatory effects of BST treated group, total nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) levels were measured in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. *In vivo*, We injected MIA 50 μ l (60 mg/ml) into knee joints of rats to induce osteoarthritis. Rats were divided into total 3 groups (normal, control, BST treated group, each n=7). Normal group was not treated at all without inducing osteoarthritis and taken normal diet. Control group was induced osteoarthritis by MIA and taken with 2 ml of distilled water once a day for 4 weeks. BST treated group was induced osteoarthritis by MIA and taken BST 2 ml (200 mg/kg/mouse) once a day for 4 weeks. We evaluated dynamic weight bearing with the Incapacitance Test Meter. At the end of experiment, the rats were sacrificed to observe the functions of liver and kidney, changes of WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte levels in blood, to evaluate the levels of pro-inflammatory cytokines, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotriene B₄ (LTB₄) within serum. We observed change of articular structures by Hematoxylin & Eosin (H&E), safranin-O staining method and measured amount of cartilage by micro CT-arthrography. Statistical analysis was done by unpaired student's t-test with significance level at $p < 0.05$ in SPSS 11.0 for windows.

Results 1. Safety of the BST was identified. 2. AST, ALT, BUN, creatinine levels of BST treated group were within normal limit. *In vitro*, 1. DPPH and ABTS free radical scavenging activities of BST showed dose-dependent increase. 2. ROS production were significantly decreased. 3. Total nitric oxide (NO) and IL-1 β production were decreased. 4. IL-6 and TNF- α production were significantly decreased. *In vivo*, 1. Weight bearing ability was significantly increased. 2. WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte levels in blood were decreased. 3. IL-1 β and TNF- α levels in serum were significantly decreased, and the IL-6 level was decreased. 4. TIMP-1, MMP-9, LTB₄, PGE₂ levels in serum were significantly decreased. 5. Cartilage volume of BST treated group was significantly increased. Also changes of cartilage, synovial membrane, fibrous tissue were suppressed.

RECEIVED March 16, 2015
ACCEPTED March 27, 2015

CORRESPONDING TO
Min-Seok Oh, Department of
Rehabilitation Medicine of Korean
Medicine, College of Korean
Medicine, Dae-Jeon University, 75,
Daedeokdae-ro 176beongil, Seo-gu,
Daejeon 302-869, Korea

TEL (042) 470-9136
FAX (042) 470-9005
E-mail ohmin@dju.ac.kr

Copyright © 2015 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Conclusions The results obtained in this study *Bujasasim-tang* have effects of anti-oxidative, anti-inflammatory, relieve pain and protection of cartilage. Therefore we expect that *Bujasasim-tang* is effective treatment for osteoarthritis. (**J Korean Med Rehab 2015;25(2):15-35**)

Key words *Bujasasim-tang*, Osteoarthritis, Oxidative stress, Anti-inflammation, Monosodium iodoacetate (MIA)

서론»»»»

골관절염은 성인에서 가장 흔한 관절 질환으로 퇴행성 관절염 또는 퇴행성 관절질환이라고도 불리며¹⁾, 국소적인 관절에 점진적인 관절연골의 소실 및 그와 관련된 2차적인 변화와 증상을 동반하는 질환이다²⁾. 질환이 진행되면 연골하 골(subchondral bone)의 경화 및 낭종 형성, 관절 주변 및 관절 내에 과잉골 형성, 관절의 변형 등이 발생할 수 있다²⁾. 예전에는 골관절염 발생의 가장 중요한 원인으로 노령화에 따른 단순한 퇴행성 변화라고 생각했지만 최근에는 여러 연구에 의해 수많은 요인들이 관여하여 발생하는 것으로 인식되고 있다³⁾.

골관절염의 치료목적은 변형의 예방과 교정, 기능의 보존 및 회복, 통증의 완화에 있으며, 치료방법은 크게 비수술적 치료요법과 수술적 치료요법으로 구분된다. 비수술적 방법은 일차적으로 안정 및 약물치료, 물리치료, 보조기 사용 등이 있으며, 비수술적 치료 방법을 시행했으나 증상의 호전이 없으며, 일상생활에 지장이 극심한 경우에는 수술적 처치를 시행한다²⁾.

한의학적으로 골관절염은痺症에 속하는데, 관절의痺症은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎 혹은 正氣虛弱한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣運行을 저해함으로써 나타난다¹⁾. 그 증상으로는 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利가 생기며 심하면 관절의 강직성 변형을 초래한다¹⁾. 痺症의 약물치료는 緩急先後를 구분하여 隨證治之 하는 데⁴⁾, 寒者는 溫之하고 熱者는 清之하며 濕痰瘀 등의 有形之邪가 있으면 去之하고 虛者는 補之한다¹⁾. 實熱은 清泄하고 濕熱은 清熱利水하고 虛熱은 滋陰清熱시킨다¹⁾.

최근 골관절염에 대한 연구가 활기를 띠고 있는데, 저출력 레이저 요법을 이용한 연구⁵⁾, 한약을 이용한 연구⁶⁻¹⁵⁾, 약침을 이용한 연구¹⁶⁻²⁴⁾, 뜸을 이용한 연구²⁵⁾, 전침을 이

용한 연구²⁶⁾ 등에서 염증억제 작용, 진통 작용, 연골보호 작용 등이 보고되었다.

「傷寒論」²⁷⁾에 나오는 附子瀉心湯은 熱이 胃에 있어서 心下痞가 있고 陽虛하여 惡寒汗出할 때 陽虛를 扶助하고 痞熱을 泄解하는 처방으로²⁸⁾, 清熱瀉火, 活血逐瘀하는 효능을 가진 大黃, 清熱燥濕하는 黃連, 黃芩, 溫裏, 扶陽, 祛寒하는 附子로 구성되어 있다²⁹⁾. 附子瀉心湯은 清熱燥濕, 溫裏祛寒, 扶陽하는 효능이 있어 風寒濕熱이 관절에 응체되어 발생한 痺症에 유효할 것으로 생각된다. 특히, 附子の 연골보호에 대한 효능이 여러 연구^{9-11,14,15)}에서 보고되었기 때문에 附子瀉心湯 역시 골관절염 치료에 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

이에 저지는 附子瀉心湯의 항산화능과 항염증 효능을 검증하고, Monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 골관절염 rat 모델을 이용하여 염증 cytokine 및 염증 매개 인자에 미치는 영향에 대해 분석했다. 또한 연골량을 측정하고, 관절조직을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 세포

세포는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입한 RAW 264.7을 사용했다.

2) 약재

약재는 (주)오니허브(대구, 한국)에서 구입하였고, 대전대학교 지역혁신센터 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC)에서 정선 후 사용하였다. 附子瀉心湯

1첩 당 용량과 구성은 「古方撰次」³⁰⁾를 기준으로 하였다 (Table I).

3) 동물

동물은 수컷 6주령의 SD-Rat (170~200 g)을 사용하였는데, (주)라온바이오(용인, 한국)에서 골관절염 유발물질인 MIA를 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 μ l (60 mg/ml)씩 투여하고 7일이 지난 후 관절염이 유발된 쥐만을 공급받아 실험하였다. 동물은 실험 당일까지 일반 고형사료(푸리나, 서울, 한국)를 충분히 공급하고 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 55 \pm 15%, 12시간 명암주기(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대 동물실험윤리위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호-DJUARB2013-006)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실시하였다. 일반 사료의 kg당 조성내용과 분량은 다음과 같다(Table II).

4) 시약

본 실험에 사용된 시약 lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배양액, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone Co. (Logan, Ut, USA), Cell viability assay kit는 Daeillab service Co. (서울, 한국), Nitric Oxide detection kit는 Intron Biotechnology Co. (수원, 한국)에서 구입하였다. 중금속 분석을 위한 HNO₃은 Duksan Co. (안산, 한국)에서, As, Pb, Hg, Cd standard solution은 SCP Science Co. (Quebec, Canada)에서 구입하였고, HPLC 분석을 위한 water와 acetonitrile은 Duksan Co. (안산, 한국)의 HPLC 용매를 사용하였으며, Folin-Giocalteu's phenol reagent는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)에서, gallic acid와

sodium carbonate는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Cytokine Milliplex Map Immunoassay kit는 Millipore Co. (Bellerica, MA, USA)에서, Rat Total MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), LTB₄ (leukotriene B₄), PGE₂ (Prostaglandin E₂) ELISA kit, Rat TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) kit, Rat IL-6 (interleukin-6) kit, Rat TNF- α (tumor necrosis factor- α) kit, Rat IL-1 β (interleukin-1 β) kit는 R&D System Co. (Minneapolis, USA), 주정추출에 이용된 주정은 (주)주정 판매월드(전주, 한국)에서 구입하였다. 골관절염 유발 주사제로는 Monosodium iodoacetate (MIA) (Sigma, USA), 마취제로는 Zoletil (Virbae S.A., France)과 Rompun (바이엘코리아, 서울, 한국)을 사용하였다. Hematoxylin and Eosin 염색과 Safranin-O 염색에는 Hematoxylin (Merck Co., Germany), Eosin Y (Wako Co., Japan), Safranin-O (Merck Co., Germany)를, Micro CT arthrography의 조영제는 Hexabrics 320 (Guerbet Co., France)을 사용하였다.

5) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), Freeze dryer (일신바이오메이스, 한국), ELISA reader (Molecular Devices, USA), Luminex (Millipore Co., USA), ICP (Shimadzu Co., Japan), 수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, USA), HPLC (Shimadzu LC-20AD, Japan), HPLC column (ZORBAX Eclipse Plus C18, 250 \times 4.6 mm, 5 μ m), Flow cytometry system (BD Biosciences immunocytometry systems, USA), Insulin syringe (0.25 mm \times 8 mm, BD Medical-Diabetes Care, USA), Incapacitance Test Meter (IITC Life Science, California, USA), 자동혈구측정기(MS9-5, MELET SCHLOESING, France), Minos-ST (BECKMAN COULTER LH780, BECK-

Table I. The Prescription of *Bujasasim-tang*

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight (g)
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	6
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	3
附子	<i>Aconiti Lateralis Radix Preparata</i>	3
Total amount		15

Table II. The Components of Normal Diet

Components	Percentage (%)
Crude protein	20.0
Crude fat	4.5
Crude fiber	6.0
Crude calcium oxide	7.0
Calcium	0.5
Phosphorus	1.0
Total amount	39.0

MAN COULTER, USA), Light Microscope (Carl ZEISS, Germany), micro CT arthrography (Skyscan 1076, Brucker, Germany)를 이용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

附子瀉心湯 6첩을 80% 주정 1 l에 넣고 3시간 동안 환류 추출하였다. 그 여액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축하여 동결 건조하였다. 완전 건조된 附子瀉心湯 주정 추출물(BST, 10.8 g)을 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

2) 중금속 검사

납, 비소, 카드뮴 분석의 경우 BST 0.5 g을 극초단파 시료 전처리장치 전용용기에 넣고 질산 10 ml를 넣은 후, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생 가스를 제거하고 극초단파 시료전 처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 다음 분해액을 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물을 넣어 적절하게 표준액의 농도범위로 희석하여 검액으로 하였다. 따로 질산 10 ml를 극초단파 시료전 처리장치 전용용기에 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합플라즈마분광계(ICP)를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 BST 50 mg을 정확하게 달아 특별한 전처리 과정 없이 수은분석기를 이용하여 측정하였다.

3) HPLC 분석

BST 30 mg을 80% 주정 1 ml에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 이 중 20 μ l를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu Co.의 system controller (CBM-20A), pump (LC-20AD), column oven (CTO-20A), diode array detector (SPD-M20A), column을 사용하였다. 이동상은 water (A)와 acetonitrile (B)로 gradient elution system을 적용시켜 0~5분(0% B), 5~40분(30% B), 40~60분(80% B), 60~80분(100% B)으로 설정하였다. 유속은 1.0 ml/min이었으며 column 온도는 40°C를 유지하였고, UV wavelength는 210 nm로 설정하여 분석하였다.

4) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하는 방법으로 측정하였다. 추출 시료용액 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 ml와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (Gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

3. In vitro 및 In vivo

1) In vitro

(1) 세포독성 검사

RAW 264.7 세포는 96 well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, BST 및 개별약제 추출물을 각각 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 WST solution을 첨가하여 배양기(37°C, 5% CO_2)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

(2) 항산화능 측정

① DPPH 소거율

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정적인 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 주정에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μ l와 BST 및 4가지 개별약제의 주정 추출물 1, 10, 100, 1,000 μ g/ml 100 μ l를 각각 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 물을 넣었으며, DPPH 용액 대신 주정을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

소거율 (%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

② ABTS 소거율

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plates에 맞게 수정하여 실시하였다. BST는 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS+)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS+ 용액 150 μl 와 BST를 각각 5 μl 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거율을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

③ ROS 생성

RAW 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plates에 RAW 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양한 후, BST를 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모든 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후, DCF-DA 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

(3) 항염증 효능 측정

① Total nitric oxide (NO) 생성

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, BST를 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서

암소 반응 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

② 염증 cytokine 생성

RAW 264.7 세포를 12 well plates에 1.5×10^5 cells/ml가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, BST를 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다.

2) In vivo

(1) 관절염 유발 및 실험군 분류

마취제(졸레틸 0.5 ml+럼폰 0.1 ml)로 rat를 마취하고 오른쪽 무릎관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA를 인슐린 1 ml 주사기로 무릎 관절강 내에 50 μl (60 mg/ml)씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9% saline을 사용하였다. 관절염의 유발을 확인하기 위해 MIA 투여 7일 후, 환측 관절부위의 부종과 압통을 기준으로 선별하였다. 실험군은 관절염을 유발하지 않은 정상군과 관절염을 유발하고 증류수를 투여한 대조군, 관절염을 유발하고 BST를 투여한 실험군 등 총 3그룹으로 각각 7마리씩 분류하였다.

부종의 크기는 캘리퍼스를 이용하여 환측 무릎관절의 외측과 내측 측부인대 사이의 직경을 mm 단위로 측정하였다. 압통의 정도는 3명의 실험자가 각각의 실험동물의 다리를 저는 모습과 관절낭에 압력을 가했을 때 통증을

Table III. Edema and Tenderness of the Right Knee on Arthritis Rats

Group		Knee joint diameter (mm)	Tenderness*
Nor (n=7)	before	8.38±0.18	0.0±0.0
	after	8.60±0.14	0.0±0.0
Con (n=7)	before	8.51±0.31	0.0±0.0
	after	10.40±0.16	4.14±0.64
BST (n=7)	before	8.53±0.15	0.0±0.0
	after	10.68±0.10	4.00±0.53

The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats.

Nor: Normal SD-rat group. Con: MIA-induced osteoarthritis group. BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST. *Pain score (0-6 point).

피하기 위한 모습을 육안으로 관찰하였고, 각각 0~3까지 등급으로 배점하여 합산 후 그 평균값을 아래와 같이 나타내었다(Table III).

(다리 저는 모습 등급 0~3)+(압통에 반항하는 정도 0~3)=총계 0~6

(2) 약물 투여

SD-rat의 오른쪽 무릎 관절강 내에 MIA를 주사하여 관절염을 유발하였다. 관절염이 유발된 쥐만을 선택하여 각각 7마리씩 대조군과 실험군으로 분류하고, 1주일일 경과된 이후부터 실험군에는 매일 오전 10시에 한번씩 BST 2 ml (200 mg/kg)를 4주 동안 경구투여 하였다. 대조군에는 같은 방법으로 생리식염수를 경구투여 하였다.

(3) 체중 부하 검사

뒷다리 체중 부하는 Incapacitance Test Meter를 이용하여, 플라스틱방에 비스듬히 세운 후 각 뒷다리에 가해진 세기를 10초에 걸쳐 평균산출하였다. 처치된 환측의 뒷다리에 분포된 체중의 백분율은 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Weight bearing (\%)} = \left(\frac{\text{유발된 하지의 무게}}{\text{정상 하지의 무게}} \right) \times 100$$

(4) 혈액학적 분석

최종 실험 종료 후 혈청 내에서 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), creatinine, BUN (blood urea nitrogen) 활성도를 측정하기 위해 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 천자법을 이용하여 혈액 10 ml를 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 전혈과 혈청을 서울의과학연구소(서울, 한국)에 분석 의뢰하여 총 백혈구, 백혈구 중 호중구, 단핵구, 림프구의 분포도와 AST, ALT, creatinine, BUN을 측정하였다. 혈구세포수는 자동 혈구측정기로 Fonio법에 준하여 Minos-ST로 측정했으며, AST, ALT 활성도는 JSCC UV method의 원리, creatinine의 함량은 Creatinine Jaffe Method의 원리, BUN의 함량은 Kinetic UV assay의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

(5) 염증 cytokine 및 염증 매개 인자 측정

혈청 내에서 염증 사이토카인을 측정하기 위하여 lumi-

nex를 사용하였다. 혈액을 채취하여 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6, TNF-α, TIMP-1을 측정하였고, ELISA를 사용하여 MMP-9, LTB₄, PGE₂를 측정하였다.

(6) 연골량 측정

연골량 측정은 연세대학교 원주캠퍼스 의공학부 전산 의용생체공학 연구실(원주, 한국)에 의뢰하여 실시하였으며, 조형제인 헥사브릭스(HEXABRICS 320)를 꼬리 정맥에 주사한 후 micro CT-arthrography를 사용하여 무릎관절의 연골량(cartilage volume)을 측정 및 분석하였다.

(7) 조직병리학적 검사

Micro-CT 촬영이 끝난 후 무릎 부위를 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% 포르말린 용액에 넣어 관절 조직을 탈칼슘화(decalcification)시켰다. 방사선촬영기법(radiographic technique)을 이용하여 탈칼슘화 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정된 다음 관상절단(coronal section)을 실시하였다. 탈칼슘화 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μm의 크기로 자른 뒤, Hematoxylin and Eosin (H&E) 및 Safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증세포의 조직 침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인할 수 있으며, proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인하였다.

4. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 세 번 이상의 반복된 실험 결과를 평균±표준편차로 나타내었고, SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 사용하여 통계처리 하였다. p-values가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 보았다.

결과»»»»

1. 중금속 함량

중금속 함량을 측정한 결과, 납과 카드뮴의 경우 기준치 이하로 검출되었고 비소와 수은은 검출되지 않았다

(Table IV).

2. HPLC 분석

HPLC를 이용하여 pattern 분석한 결과, 210 nm에서 retention time이 24.06분과 26.17분대에 peak를 나타내었다(Fig. 1).

3. 총 폴리페놀 함량

Gallic acid를 표준물질로 하여 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 103.44 ± 1.29 mg/g으로 나타났다(Table V).

Table IV. Content of Pb, As, Cd and Hg of BST

	Pb	As	Cd	Hg
Permissive density (mg/kg)	5	3	0.3	0.2
BST	0,099	N,D.*	0,026	N,D.

*N,D.: Not detected.

Table V. Total Phenolic Contents of BST

Sample	Total phenolics (mg GAE*/g ext.)
BST	103.44 ± 1.29

*Total phenolic contents were expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract.

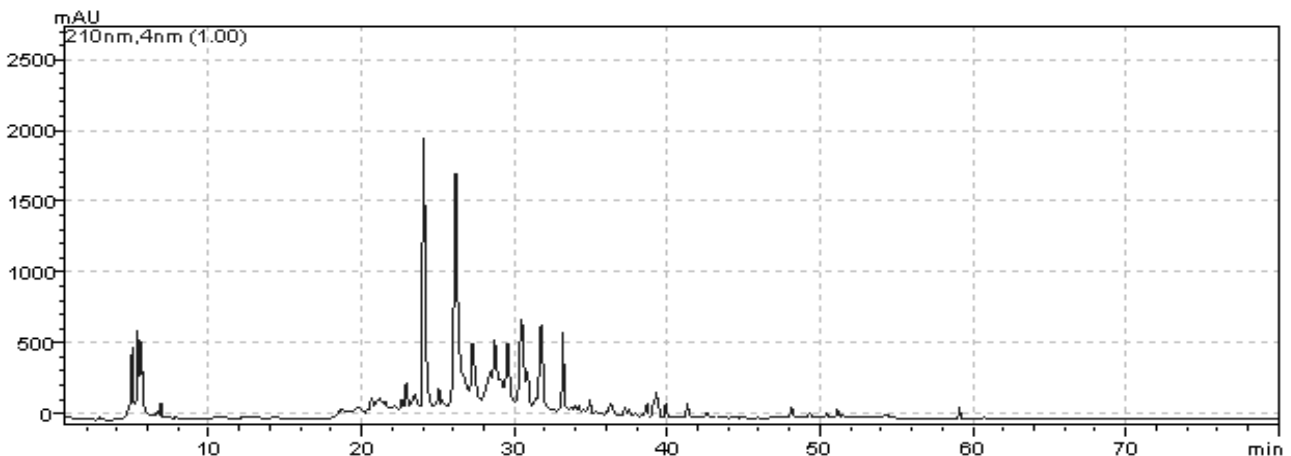


Fig. 1. HPLC chromatogram of BST.

Column: ZORBAX Eclipse Plus C18 (250×4.6 mm, 5 μm), sample injection volume: 20 μl, mobile phase: H₂O (A)/ACN (B) gradient elution: 0~5 mins (0% B), 5~40 mins (30% B), 40~60 mins (80% B), 60~80 mins (100% B), flow rate: 1.0 ml/min, detector: PDA detector.

4. In vitro

1) 세포 독성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 세포 생존율은 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때, BST 투여군은 1 μg/ml 농도에서 $106.0 \pm 5.9\%$, 10 μg/ml 농도에서 $99.2 \pm 7.0\%$, 100 μg/ml 농도에서 $102.8 \pm 5.6\%$ 로 나타났다(Fig. 2).

2) 항산화능에 미치는 영향

(1) DPPH 소거율

DPPH 소거율은 1 μg/ml 농도에서 $9.2 \pm 1.8\%$, 10 μg/ml

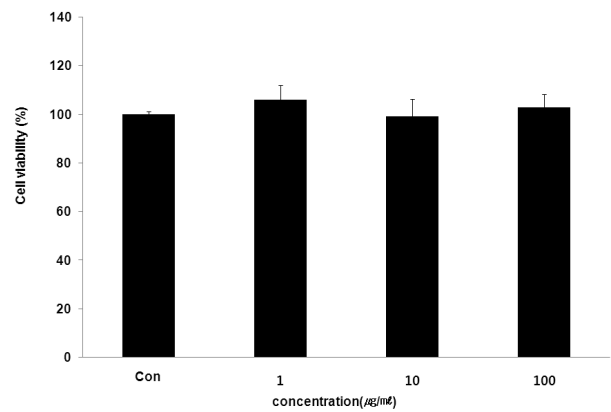


Fig. 2. Effects of BST on the cell viability of RAW 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10, 100 μg/ml of BST for 24 hours. Cell viability was determined using the WST assay. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

ml 농도에서 $15.2 \pm 5.4\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $84.1 \pm 1.0\%$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $92.4 \pm 4.7\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

(2) ABTS 소거율

ABTS 소거율은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $0.0 \pm 0.9\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $3.6 \pm 0.5\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $46.1 \pm 1.3\%$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $92.8 \pm 1.8\%$ 로 나타나, 농도 의존적으로 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

(3) ROS 생성

BST의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$

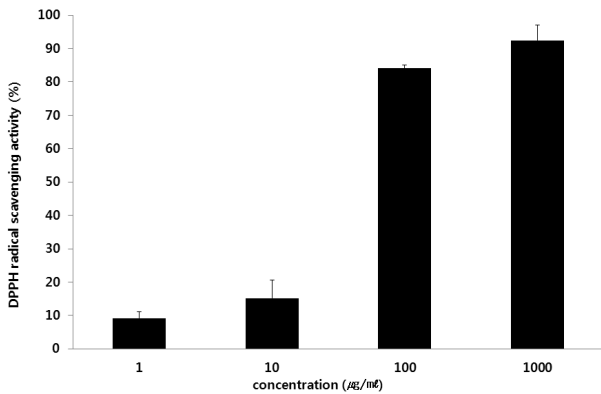


Fig. 3. DPPH free radical scavenging activity of BST at various concentration. Extracts were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

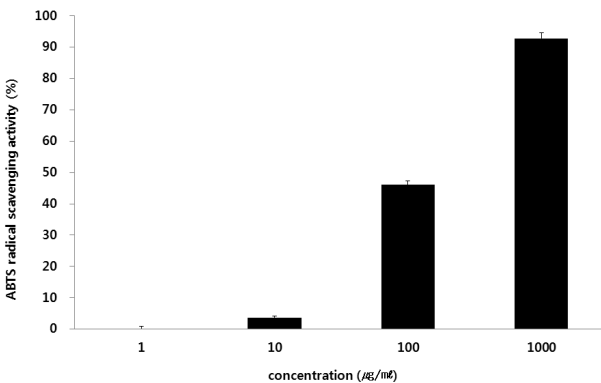


Fig. 4. ABTS free radical scavenging activity of BST at various concentration. Extracts were incubated with ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

로 나타냈을 때, 정상군은 $20.11 \pm 5.6\%$, BST 투여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $96.61 \pm 6.3\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $75.60 \pm 8.0\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $65.67 \pm 8.3\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $34.3 \pm 8.3\%$ 로 유의성 있게(* $p < 0.05$) 감소되었다(Fig. 5).

3) 항염증 효능에 미치는 영향

(1) NO 생성

NO 생성량은 대조군을 $100 \pm 3.7\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $38.0 \pm 3.3\%$, BST 투여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $100.5 \pm 4.1\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $100.6 \pm 2.2\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $72.2 \pm 9.7\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $27.8 \pm 9.7\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

(2) 염증 cytokine 생성

① IL-1 β

BST의 IL-1 β 생성량을 측정된 결과, 대조군이 21.6 ± 2.3 pg/ml, 정상군이 1.2 ± 0.2 pg/ml, BST 투여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 19.5 ± 4.2 pg/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 13.8 ± 4.1 pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 12.0 ± 3.2 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 모든 농도에서 각각 $9.7 \pm 19.6\%$, $36.1 \pm 18.8\%$, $44.4 \pm 15.0\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

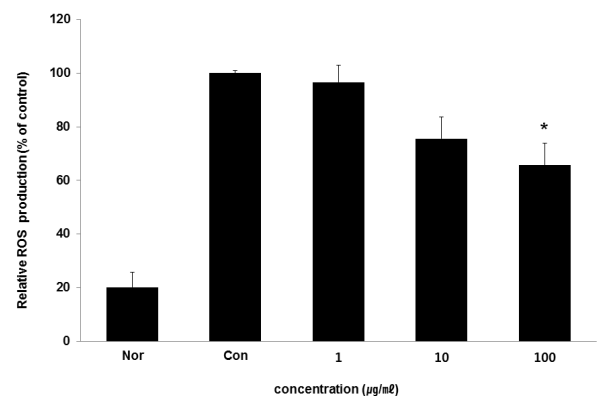


Fig. 5. Effects of BST on the ROS production in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were stimulated with LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ and treated with BST 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by unpaired student's t-test (* $p < 0.05$).

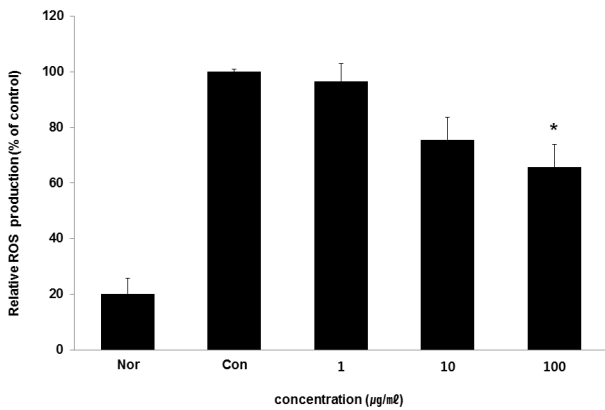


Fig. 6. Effects of BST on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS 1 μg/ml and 1, 10, 100 μg/ml of BST for 24 hours. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

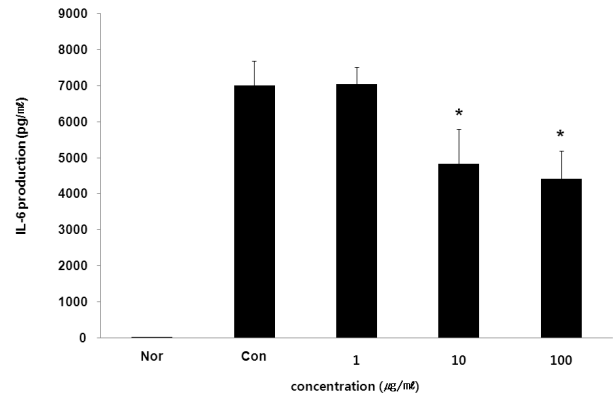


Fig. 8. Effects of BST on LPS-stimulated IL-6 production in RAW 264.7 cells.

Cells were treated with LPS 1 μg/ml and 1, 10, 100 μg/ml of BST for 24 hours. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by unpaired student's t-test (*p<0.05).

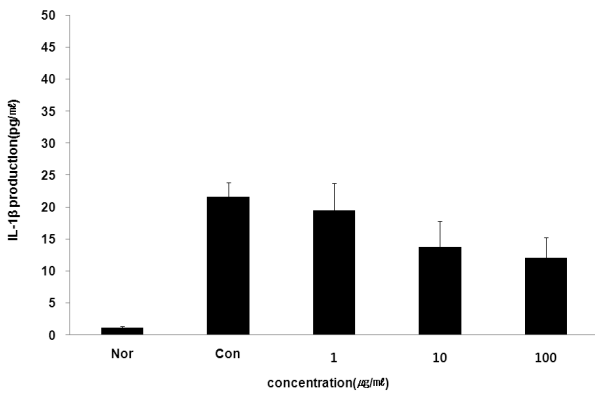


Fig. 7. Effects of BST on LPS-stimulated IL-1β production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS 1 μg/ml and 1, 10, 100 μg/ml of BST for 24 hours. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

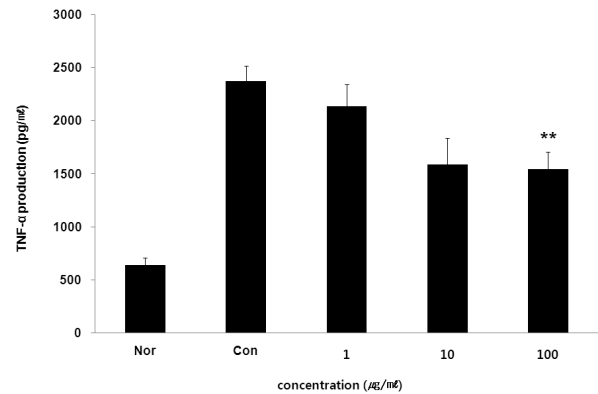


Fig. 9. Effects of BST on LPS-stimulated TNF-α production in RAW 264.7 cells.

Cells were treated with LPS 1 μg/ml and 1, 10, 100 μg/ml of BST for 24 hours. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by unpaired student's t-test (**p<0.01).

② IL-6

BST의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군이 6999.7±683.6 pg/ml, 정상군이 13.8±5.0 pg/ml, BST 투여군은 1 μg/ml 농도에서 7025.1±485.1 pg/ml, 10 μg/ml 농도에서 4813.1±971.2 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 4402.5±789.8 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 10 μg/ml 농도에서 31.2±13.9%, 100 μg/ml 농도에서 62.3±11.3%로 유의성 있게(*p<0.05) 감소되었다(Fig. 8).

③ TNF-α

BST의 TNF-α 생성량은 대조군을 2369.8±143.7 pg/

ml로 나타냈을 때, 정상군은 638.7±65.9 pg/ml, BST 투여군은 1 μg/ml 농도에서 2133.6±210.6 pg/ml, 10 μg/ml 농도에서 1582.0±256.3 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 1541.3±161.8 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 100 μg/ml 농도에서 35.0±6.8%로 유의성 있게(**p<0.01) 감소되었다(Fig. 9).

5. In vivo

1) 체중 부하에 미치는 영향

체중 부하 정도를 측정한 결과, 대조군의 측정값을 $100 \pm 14.7\%$ 로 나타냈을 때, 정상군에서 $202.6 \pm 5.5\%$, BST 투여군은 $135.0 \pm 6.2\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 유의성 있게(* $p < 0.05$) 증가되었다(Fig. 10).

2) 간 기능에 미치는 영향

ALT의 경우 대조군(36.1 ± 2.8 U/L)이 정상군(23.3 ± 0.9 U/L)에 비하여 높았으며, BST 투여군(32.0 ± 4.1 U/L)은 대조군에 비해 $11.4 \pm 11.5\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

AST의 경우 대조군(139.7 ± 9.5 U/L)이 정상군(92.7 ± 2.3 U/L)에 비하여 높았으며, BST 투여군(110.1 ± 11.2 U/L)은 대조군에 비해 $21.2 \pm 8.0\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

3) 신장 기능에 미치는 영향

(1) Creatinine

혈청 중의 creatinine 농도를 측정한 결과 정상군은 0.54 ± 0.02 mg/dl, 대조군은 0.59 ± 0.04 mg/dl, BST 투여군은 0.57 ± 0.02 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 $3.4 \pm$

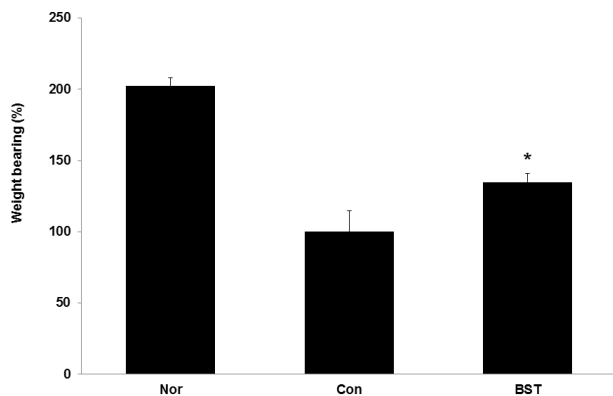


Fig. 10. Effect of BST on weight change in the hind paw of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (* $p < 0.05$). Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

3.8% 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 12).

(2) BUN

혈청 중의 BUN 농도를 측정한 결과, 정상군은 16.76 ± 1.59 mg/dl, 대조군은 17.87 ± 0.80 mg/dl, BST 투여군은 17.51 ± 1.77 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 $2.0 \pm 9.9\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 13).

4) 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

(1) 총 백혈구 생성량

백혈구 생성량은 대조군의 생성량을 11.93 ± 1.29 Thous/ μ l로 나타냈을 때, 정상군이 10.87 ± 0.82 Thous/ μ l,

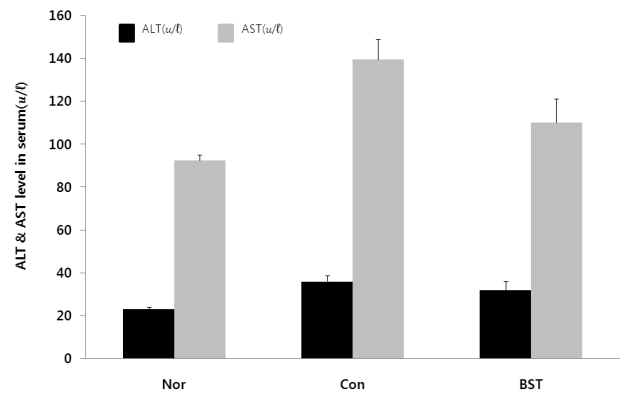


Fig. 11. Effects of BST on the ALT and AST in MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

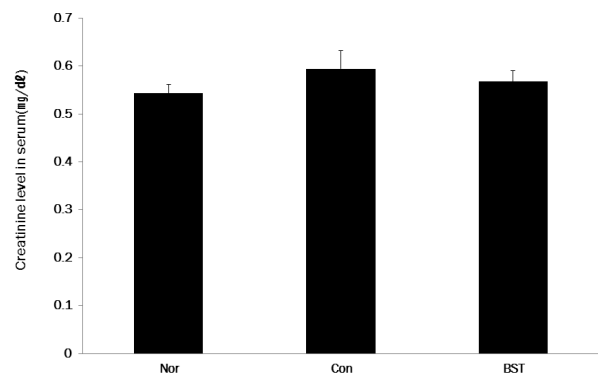


Fig. 12. Effect of BST on the creatinine in MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

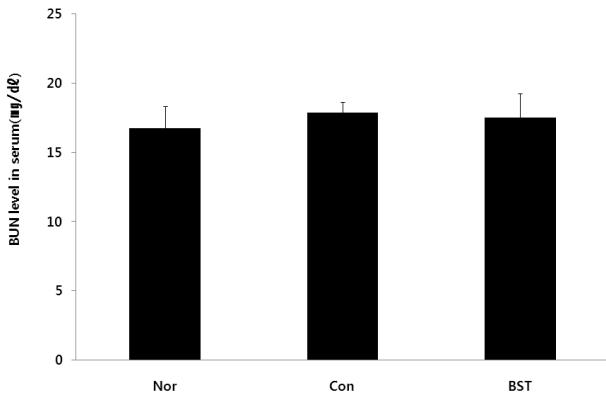


Fig. 13. Effect of BST on the BUN in MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

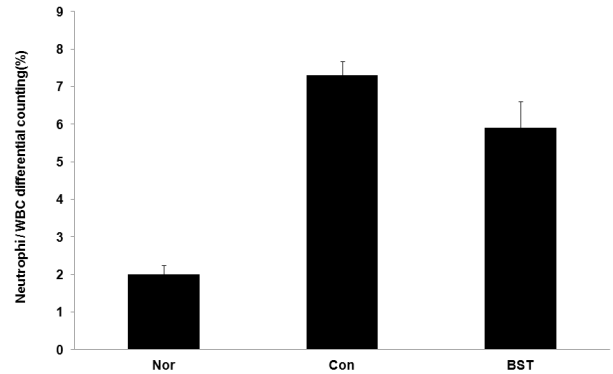


Fig. 15. Effect of BST on level of neutrophil in the blood of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

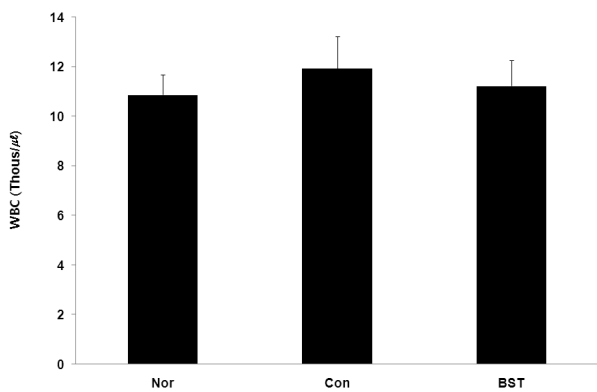


Fig. 14. Effect of BST on level of WBC in the blood of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

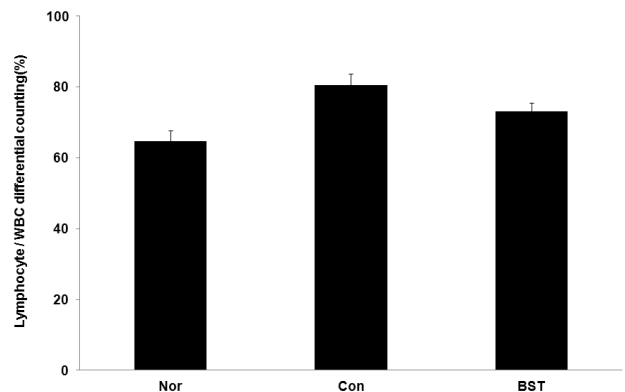


Fig. 16. Effect of BST on level of Lymphocyte in the blood of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

BST 투여군이 11.23 ± 1.04 Thous/ μ l로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 $5.9 \pm 8.7\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 14).

(2) 호중구 생성량

백혈구에 대한 호중구의 비율은 대조군을 $7.30 \pm 0.38\%$ 로 나타냈을 때, 정상군이 $2.00 \pm 0.24\%$, BST 투여군이 $5.90 \pm 0.71\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 $19.2 \pm 9.8\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 15).

(3) 림프구 생성량

백혈구에 대한 림프구의 비율은 대조군을 $80.57 \pm 3.15\%$ 로 나타냈을 때, 정상군이 $64.60 \pm 3.12\%$, BST 투여

군이 $73.13 \pm 2.33\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 $9.2 \pm 2.9\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 16).

(4) 단핵구 생성량

백혈구에 대한 단핵구의 비율은 대조군을 $5.61 \pm 0.38\%$ 로 나타냈을 때, 정상군이 $2.09 \pm 0.23\%$, BST 투여군이 $4.36 \pm 0.30\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 $22.3 \pm 10.4\%$ 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 17).

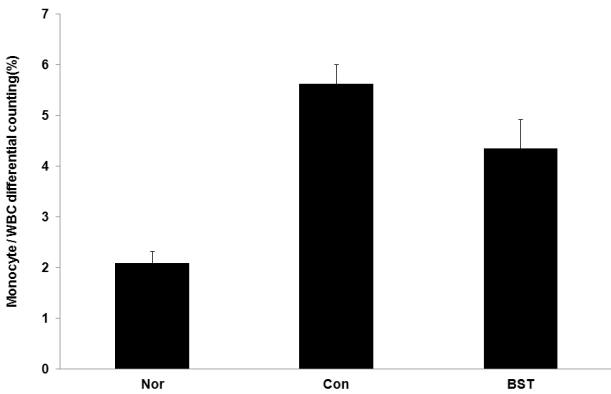


Fig. 17. Effect of BST on level of Monocyte in the blood of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group. Con: MIA-induced osteoarthritis group. BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

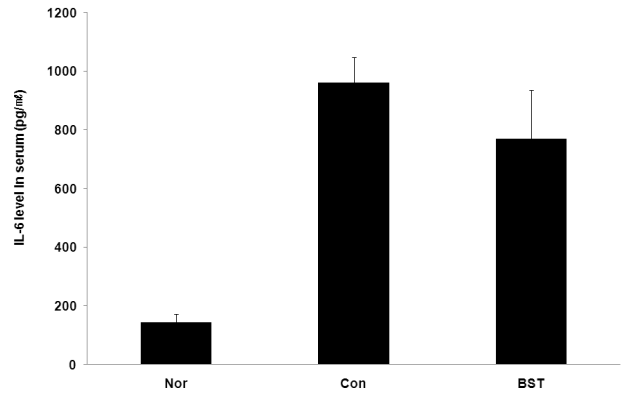


Fig. 19. Effect of BST on level of IL-6 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Nor: Normal SD-rat group. Con: MIA-induced osteoarthritis group. BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

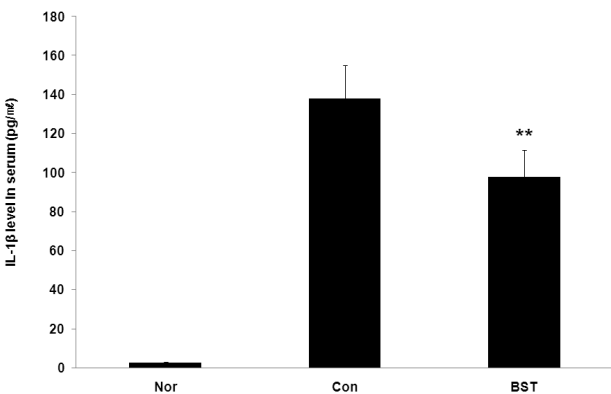


Fig. 18. Effect of BST on level of IL-1β in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (**p<0.01). Nor: Normal SD-rat group. Con: MIA-induced osteoarthritis group. BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

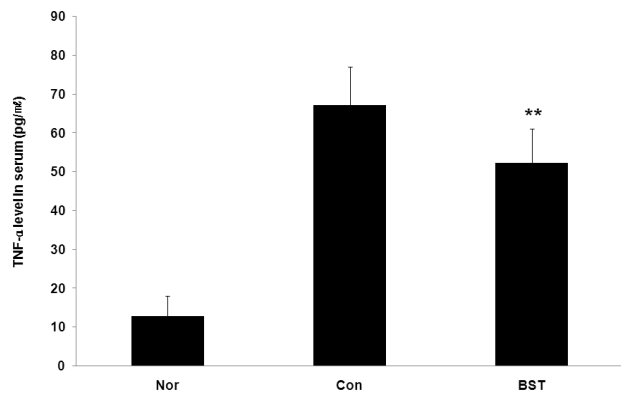


Fig. 20. Effect of BST on level of TNF-α in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (**p<0.01). Nor: Normal SD-rat group. Con: MIA-induced osteoarthritis group. BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

5) 염증 cytokine 및 염증 매개 인자에 미치는 영향

(1) IL-1β

혈액 내의 IL-1β 생성량을 측정한 결과 정상군은 2.6±0.5 pg/ml, 대조군은 138.1 ±16.9 pg/ml, BST 투여군은 97.8±13.8 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 29.2±10.0%로 유의성 있게(**p<0.01) 감소되었다(Fig. 18).

(2) IL-6

혈액 내의 IL-6 생성량을 측정한 결과 정상군은 144.3±

28.3 pg/ml, 대조군은 962.7±84.3 pg/ml, BST 투여군은 771.2±165.0 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 19.9±17.1% 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 19).

(3) TNF-α

TNF-α 생성량을 측정한 결과 정상군은 12.8±5.3 pg/ml, 대조군은 67.0±9.9 pg/ml, BST 투여군은 52.2±8.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 22.1±13.3%로 유의성 있게(**p<0.01) 감소되었다(Fig. 20).

(4) TIMP-1

혈액 내의 TIMP-1 생성량을 측정한 결과 정상군은

7435.8±703.5 pg/ml, 대조군은 19547.8±2433.1 pg/ml, BST 투여군은 13092.0±2119.6 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 33.0±10.8%로 유의성 있게(**p<0.01) 감소되었다(Fig. 21).

(5) MMP-9

혈액 내의 MMP-9 생성량을 측정한 결과 정상군은 0.84±0.06 pg/ml, 대조군은 7.88±0.90 pg/ml, BST 투여군은 5.41±1.00 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 31.4±12.6%로 유의성 있게(*p<0.05) 감소

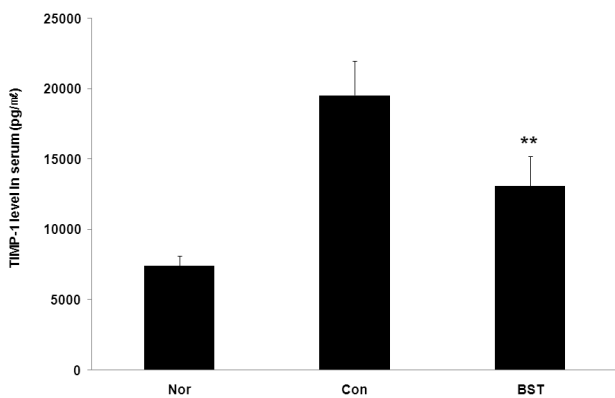


Fig. 21. Effect of BST on level of TIMP-1 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (**p<0.01). Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

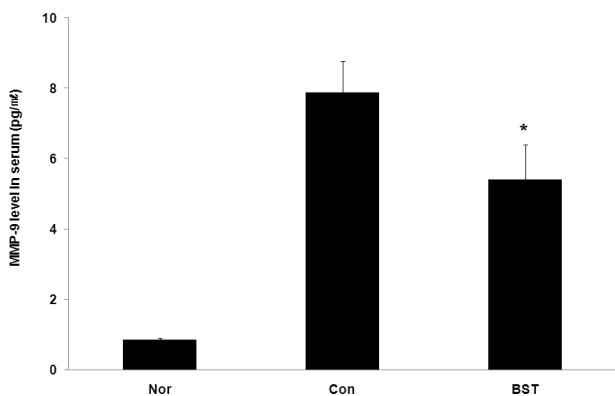


Fig. 22. Effect of BST on level of MMP-9 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (*p<0.05). Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

되었다(Fig. 22).

(6) LTB₄

혈액 내의 LTB₄ 생성량을 측정한 결과 정상군은 306.9±10.1 pg/ml, 대조군은 535.2±56.5 pg/ml, BST 투여군은 431.0±56.0 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 19.5±10.5%로 유의성 있게(*p<0.05) 감소되었다(Fig. 23).

(7) PGE₂

혈액 내의 PGE₂ 생성량을 측정한 결과 정상군은

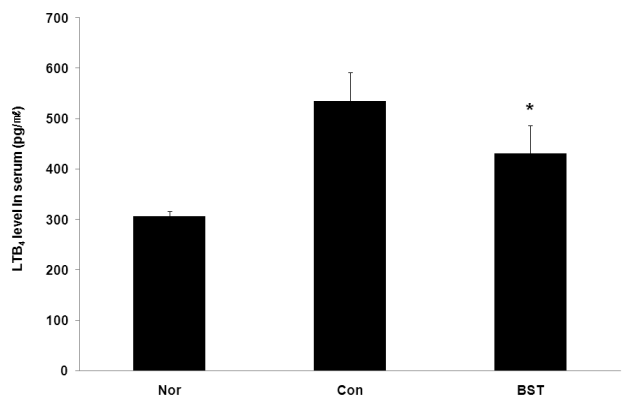


Fig. 23. Effect of BST on level of LTB₄ in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (*p<0.05). Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

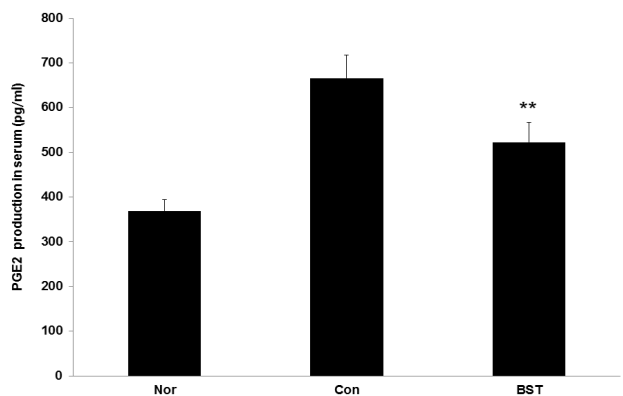


Fig. 24. Effect of BST on level of PGE₂ in the serum of MIA-induced osteoarthritis rat. The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (**p<0.01). Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

368.8±25.4 pg/ml, 대조군은 665.6±52.2 pg/ml, BST 투여군은 522.6±43.6 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 21.5±6.6%로 유의성 있게(**p<0.01) 감소되었다(Fig. 24).

6) 연골량에 미치는 영향

무릎관절의 연골 파괴정도를 micro CT-arthrography를 이용하여 측정한 결과 정상군의 연골량은 1.39±0.16 mm³로, 대조군의 연골량은 0.28±0.05 mm³로, BST 투여군의 연골량은 0.70±0.14 mm³로 나타나, 대조군에 비해 BST 투여군에서 153.2±48.8%로 유의성 있게(***p<0.001) 증가되었다(Fig. 25).

7) 조직병리학적 변화에 미치는 영향

(1) Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

무릎 관절내 활막세포의 변화 및 염증세포 침윤 여부를 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군의 연골, 활막, 섬유조직은 정상적이었다. 대조군은 골관절염이 유발되어 정상군보다 연골, 활막, 섬유조직의 변형이 현저하게 나타났다. BST 투여군은 대조군에 비해 연골, 활막, 섬유조직의 변형이 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 26).

(2) Safranin-O 염색

Safranin-O 염색을 실시한 결과 정상군의 관절조직은

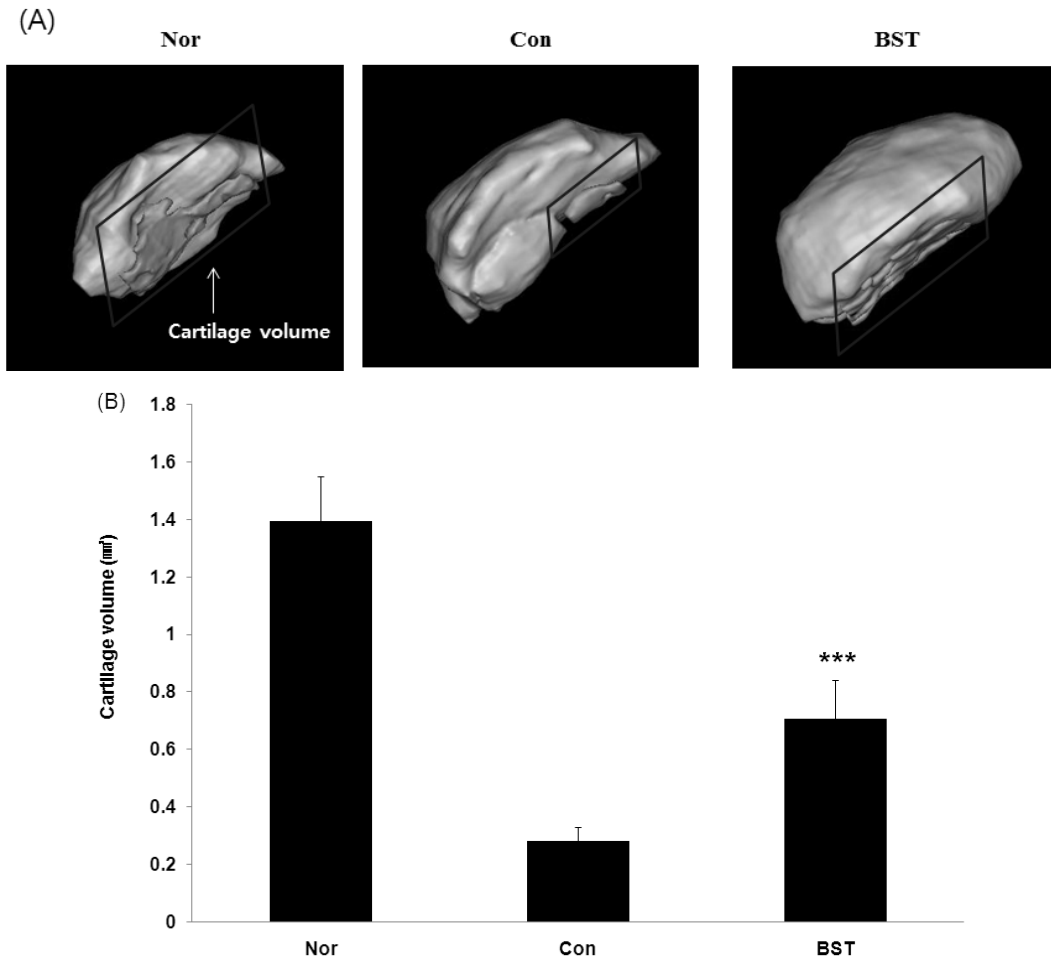


Fig. 25. Effect of BST on imaging of cartilage degeneration using micro CT-arthrography in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rat.

The results were expressed as mean±S.D. from 7 osteoarthritis rats. Statistically significant value compared with control group by unpaired student's t-test (***p<0.001).

Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

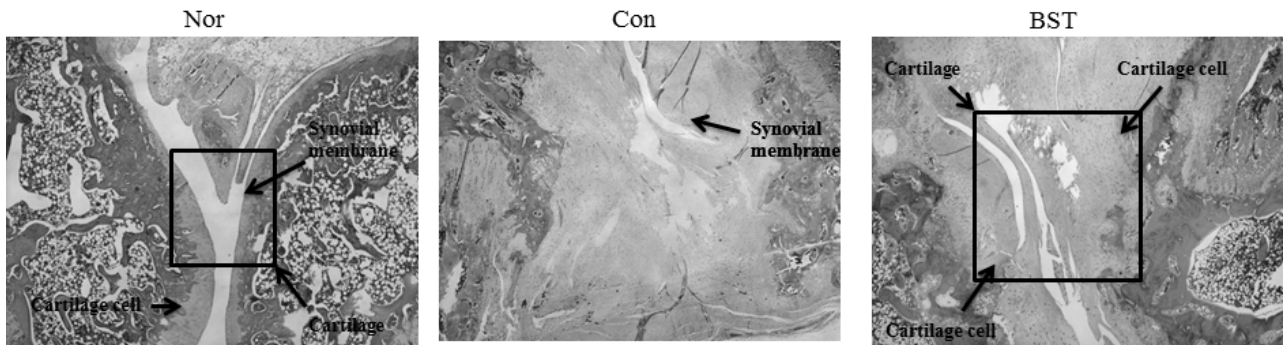


Fig. 26. Effect of BST on joint pathology (Hematoxylin & Eosin staining) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rat. Normal group shows the presence of slightly thickened synovium (arrow). Control group shows isolated areas with chronic inflammation (arrow). BST treated group shows signs of tissue integrity with a thick layer of cartilage compared with control group (arrow).

Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

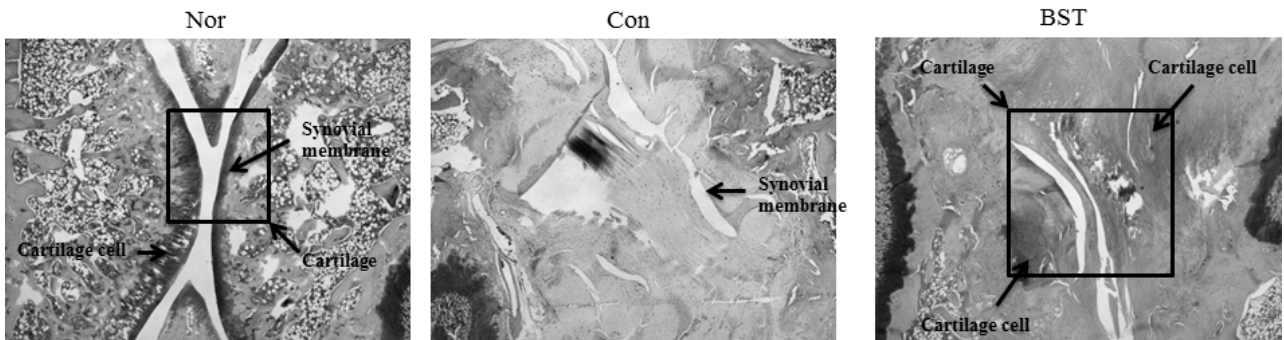


Fig. 27. Effect of BST on joint pathology (Safranin-O staining) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rat. Normal group shows stain intensity of red color in proportion to proteoglycan content (arrow). Control group shows red color disappeared in most of articular cartilage (arrow). Proteoglycan contents in articular cartilages of the BST treated group were increased compared with control group (arrow).

Nor: Normal SD-rat group, Con: MIA-induced osteoarthritis group, BST: MIA-induced osteoarthritis group treated with BST.

정상적이고, 활막 주변에 연골세포의 분포가 관찰되었다. 대조군은 골관절염이 유발되어 관절조직이 변형되고, 활막 주변에 연골세포의 손실이 많이 일어났다. BST 투여군은 대조군에 비해 관절조직의 변형이 억제되고, 연골세포의 손실도 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 27).

고찰»»»»»

골관절염은 관절 연골의 손상 및 관절 주변부위 골의 변화와 연관되어 동반되는 여러 관절증상을 일으키는데³¹⁾, 관절연골과 연골하골 조직의 항상성을 변화시키는 생체역학과 물질대사 요인이 복합적으로 작용하며 동화작용보다 이화작용이 증가한다³²⁾.

최근에 골관절염의 발생기전으로 유력한 가설은 세 단계의 중복되는 과정으로 설명된다. 첫 번째 단계는 여러 기계적인 자극이나 염증으로 인한 효소반응, 대사의 변화 등으로 시작되며, 분자수준에서 기질고분자(matrix macromolecule)의 격자(frame work)가 파괴되며 수분함량에 변화가 생겨 추가 손상에 매우 약한 상태가 된다. 두 번째 단계는 연골세포가 조직 손상이나 변화를 감지하면서 시작되는데 동화작용 및 이화작용이 모두 증가된다. 이화작용 및 파괴에 관여하는 효소(cytokine)로 IL-1과 TNF- α 가 중요하다. 기질고분자의 생성을 촉진하고 연골세포의 증식을 자극하는 동화작용에 관여하는 인자로는 IL-6, 성장인자, 인슐린, 인슐린양 성장인자(IGF-1), 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), β 변형성장인자(TGF- β) 등이 있다. 세 번째 단계는 치유와 재형성 과정이 실패함으

로써 진행되며 점진적인 관절연골의 소실 및 연골세포의 동화작용 및 증식반응의 감소가 나타난다. 이러한 안정과 증식의 감소는 물리적 손상뿐만 아니라 연골세포를 보호하는 기질에 의해 더 이상 보호받지 못하는 연골세포의 사멸에 의해 발생하며 관절염의 진행을 촉발시킨다²⁾.

한의학적으로痺症은 風寒濕邪가 함께 인체에 침입하여 나타나는데, 그 증상은 때로 아프고, 때로 아프지 않고, 때로 감각이 없으며, 때로 차갑고, 때로 열이 있고, 때로 건조하고, 때로 축축하다³³⁾. 痺症의 병인병리와 임상증상은 서양의학의 각종 관절염과 근골격계 통증질환과 유사한데, 특히 골관절염과 상당히 일치하며, 痛症이 가장 중요한 임상증상이다¹⁾.

痺症의 치료원칙은 宣通이며 氣血과 營衛가 順行하면 痺痛은 자연스럽게 소실된다. 風寒濕痺는 辛溫한 약으로 陽氣를 고조시켜 邪氣를 축출하고, 風熱濕痺는 散風清熱祛濕시키며, 虛한 사람의 久痺는 溫通溫散시키거나 滋陰시킨다¹⁾. 痺症의 병인과 증상의 특성으로 볼 때 「傷寒論」에 나오는 附子瀉心湯이 痺症에 효과가 있을 것으로 생각되었다.

附子瀉心湯은 ‘心下痞而復惡寒汗出者 附子瀉心湯 主之’라 하여 表症을 誤下함으로써 熱邪가 胃內에 들어가 痞가 되고, 體內的 眞陽이 허약하므로 衛氣가 충실하지 못하여 汗孔이 不閉해 汗이 나고, 外氣를 不勝해 惡寒하는 증상을 다스린다고 하였다²⁷⁾. 附子瀉心湯은 大黃, 黃連, 黃芩, 附子 등으로 구성되어 있는데²⁷⁾, 이 중 大黃은 瀉下藥으로 性味가 苦寒沈降하고 力猛善行하여 下焦에 直達하므로 腸胃의 積滯를 蕩滌하고, 血分の 實熱을 清熱瀉火하는 효능을 도와 血로 들어가 降泄시키며, 活血逐瘀의 효능이 있어 攻積, 瀉火, 逐瘀의 要藥이다²⁹⁾. 大黃 물 추출물이 MAO-B 활성 및 radical 소거효과와 밀접한 관련성이 있는 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨병과 같은 퇴행성 뇌질환에 효과가 있을 것이라는 연구³⁴⁾, 大黃 뿌리에 있는 항산화물질에 대한 연구³⁵⁾, 大黃과 大黃錠劑丸이 지질의 과산화작용과 혈청 내 지질의 개선을 위한 기능성 식품의 원료로 활용이 가능하다는 연구가 있었다³⁶⁾. 大黃의 elastase 활성 억제와 tyrosinase 억제연구에서 MMP-1 저해 활성이 관찰되었고 大黃 추출물은 노화 방지와 미백에 좋은 효과를 가진다는 내용이 보고되었다³⁷⁾.

黃芩은 清熱燥濕藥으로 寒性은 清熱하며 苦味는 燥濕하여 清熱燥濕하는 常用藥物이다. 濕熱諸證에 사용하는

데, 肺經의 熱을 瀉하는데 우수하다. 黃連과 配伍하면 清心解毒하는 작용이 증가한다²⁹⁾. 黃芩의 물 추출액이 항염 효과와 진통효과가 있다는 연구³⁸⁾, 黃芩 열수추출물이 대식세포에 대한 유의한 세포독성을 유발하지 않았으며, 항염증 효과가 유의하다는 것도 보고되었다³⁹⁾. 또한 黃芩 추출물 겔은 쥐의 paw joint에 염증을 일으키는 세포들을 유의하게 감소시켰으며 IgG 및 IgM의 혈중 항체를 유의하게 감소시켰다는 연구⁴⁰⁾와 黃芩 추출물이 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 관찰한 결과 골다공증을 포함한 골질환 예방에 효과가 있었다는 연구⁴¹⁾도 보고되었다.

黃連은 清熱燥濕藥으로 性味가 大苦大寒하여 大寒은 清熱하고, 苦味는 燥濕하여 瀉火燥濕의 효능을 가지고 있어 心火를 瀉하고 腸胃의 濕熱을 清하는 特長이 있어 清心, 除煩, 消痞, 止痢 등 濕火가 鬱結된 것을 치료하는 要藥이다²⁹⁾. 黃連 추출물은 합성 항산화제와 거의 같은 항산화력을 나타내었으며, 천연 항산화제보다는 아주 우수한 것으로 보고되었고⁴²⁾, 川黃連 추출물은 LPS에 의해 유도된 NO 및 TNF- α 의 생성을 유의적으로 감소시켰고, iNOS 유전자 발현을 억제했다는 연구⁴³⁾가 보고되었다. 또한 黃連에는 항염증에 관여하는 기능성 물질들이 있다는 연구⁴⁴⁾와 LPS 유도 RAW 264.7 세포 내 TNF- α 생성을 유의하게 억제시켰다는 보고도 있다⁴⁵⁾.

附子는 溫裏藥으로 辛熱燥烈하고 走而不守하며 純陽의 성질을 가지고 있어 위로는 心陽을 도와 通脈하고, 가운데는 脾陽을 溫하게 하여 健運시키고, 아래로는 腎陽을 補하여 益火하며 밖으로는 衛陽을 固하여 祛寒하므로 溫裏, 扶陽, 祛寒의 要藥이다²⁹⁾. 附子藥鍼이 류마티스관절염에서 윤활세포 증식과 연골과괴를 조절하는 효과를 가진다는 연구⁴⁶⁾와 흰쥐에 Adjuvant 관절염을 유발시키고, 附子藥鍼液을 注入한 後, 부종억제를, 혈장 serotonin 함량, 백혈구수, 적혈구수, 혈색소 및 적혈구침강속도 등의 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었다는 보고⁴⁷⁾도 있다. 三氣飲加味方이 파골세포 분화와 관련 유전자 발현을 감소시킴으로써 골흡수를 감소시키고, 조골세포 기능을 증가시킴으로써 골형성을 증가시켰다는 연구⁴⁸⁾와 黃連 및 附子추출물을 생쥐에게 LPS 100 ng을 주입하여 유발된 혈중 corticosterone 농도와 직장온도 변화를 확인한 결과 黃連은 염증스트레스 감소에 큰 의미가 없지만, 附子는 소량의 투여시 유의성 있는 효과가 있었다는 보고⁴⁹⁾도 있다.

이와 같이 大黃, 黃芩, 黃連의 항산화효과, 黃芩, 黃連, 附子의 항염증과 진통효과, 黃芩과 附子의 조골세포의 기능 증진 등이 실험을 통해 검증되었다. 附子瀉心湯의 개별 약재가 항산화, 항염증, 진통효과, 골질환 예방효과 등이 있으며, 약재간 상호작용으로 그 효과는 더욱 증가될 것이라 생각되어 附子瀉心湯의 산화적 손상, 염증 및 골관절염 동물병태모델에 미치는 영향에 대한 실험을 실시하게 되었다. 본 실험을 위해 rat를 대상으로 정상군과 MIA로 관절염을 유발하고 증류수를 투여한 대조군, 관절염을 유발하고 附子瀉心湯 주정 추출물(BST)을 투여한 실험군 등 총 3그룹으로 분류하였다.

동물실험에 앞서 약물의 안정성을 확보하기 위해 중금속 함량을 측정된 결과, 납과 카드뮴의 경우 기준치 이하로 검출되었고 비소와 수은은 검출되지 않았으며(Table IV), 세포독성 검사에서 세포 생존율에는 이상이 없었다(Fig. 2). BST의 DPPH와 ABTS free radical에 대한 소거율이 농도 의존적으로 증가했으며, ROS 생성 저해 활성에 미치는 영향이 유의하게 감소되었다(Table V, Fig. 3-5). 동물실험을 끝낸 후 실시한 간 기능 검사에서 ALT의 경우 BST 투여군은 대조군에 비해서는 감소했으나 유의한 차이가 없었고, AST의 경우도 BST 투여군은 대조군에 비해서는 감소하였으나 유의한 차이가 없었다(Fig. 11). 신장 기능 검사에서 혈청 creatinine 농도를 측정된 결과 BST 투여군은 대조군과 유의한 차이가 없었고(Fig. 12), 혈청 BUN 농도를 측정된 결과, BST 투여군은 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 13). ALT와 AST는 간 기능을 평가하는 지표가 되고, creatinine과 BUN은 신장 기능을 평가하는 지표가 되는 검사항목으로⁵⁰⁾, BST 및 BST 투여군에 대한 평가 결과를 볼 때 약물의 안정성에 이상이 없다고 할 수 있었다.

MIA 유발 골관절염 동물모델은 Kalbhen과 Blum이 처음으로 연구한 것으로 성인의 관절연골에서 동화작용과 이화작용이 평형을 이룬다는 사실에 근거하여 실험적으로 동화작용을 감소시키면 관절연골에서 퇴행성 변화가 생길 것이라는 가설에서 연구되었다⁵¹⁾. 암탉의 무릎 관절강 내에 MIA를 주입하면 6-8주 후 연골세포의 동화작용이 차단되어 관절연골세포의 피사가 초래되며 연골의 조직학적 및 생화학적 변화가 사람의 골관절염과 유사하여 골관절염과 관련된 연구에서 많이 이용되고 있다⁵¹⁾.

MIA는 만성적으로 관절의 퇴화를 유도하며 관절염이

유발된 다리 쪽의 체중 부하 감소로 만성통증이 유발된다. 체중 부하 검사는 관절염이 유발된 다리에 체중을 부하하지 않으려는 특징을 이용해 체중 부하를 측정하는 검사법으로⁵²⁾, 통증을 감소시키기 위해서 나타나는 자세의 변화, 몸 웅크리기, 활기와 같은 행동을 관찰하는 것보다 통증의 정도를 객관적으로 측정할 수 있다^{53,54)}. 체중 부하 검사를 실시한 결과 BST 투여군은 대조군에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 10).

혈액 내 면역세포에 미치는 영향을 검증하기 위해 총 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량에 대해 검사했다. 그 결과 BST 투여군의 총 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량이 대조군에 비해서 감소를 나타냈으나 유의성이 없었다(Fig. 14-17).

골관절염에 대한 치료효과를 검증하기 위해서는 혈액 내 염증 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 및 염증 매개 인자(TIMP-1, MMP-9, LTB₄, PGE₂)의 영향이 중요하다. IL-1은 면역반응의 조절, 염증반응, 조절작용에 관여하는 cytokine으로 연골세포로부터 MMPs의 생성과 분비를 촉진시켜 연골기질의 고분자(macromolecules)의 파괴를 증가시키며 PGE₂의 생성을 촉진시킨다^{2,55)}. IL-1 β , TNF- α 등은 NO와 PGE₂의 생산을 증가시키고⁵⁶⁾, cytokine으로 유도된 PGE₂ 합성과 COX-2 활동은 rat 골아세포 실험에서 NO에 의존적인 기전과 독립적인 기전 모두에 의해 조절된다는 연구결과도 있다⁵⁷⁾. IL-6은 주요한 염증 cytokine으로 만성 염증 면역반응의 영구화 뿐만 아니라 급성 염증의 시작에 있어 중요하며 병인과 급성 스트레스가 있을 때 숙주 방어에 중요한 역할을 한다^{58,59)}.

MMPs는 분비되는 세포에 따라 연골세포, 활액, 활막세포 등으로부터 나오는 collagenase, stromelysin, gelatinase 등의 효소로서 연골내의 aggrecan 및 collagen을 파괴한다. 또한 MMPs는 IL-1, tissue plasminogen activator, MMP activator 등에 의해 활성화되고 TGF- β , TIMP, plasminogen activator inhibitor-1 등에 의해 억제된다²⁾. 비가역적인 MMP-9의 억제는 염증, 혈관, 종양의 병인을 유의하게 치료할 수 있다고 생각된다⁶⁰⁾. TIMP는 종양세포의 이동, 침입, 전이를 포함하여 세포의 기질을 재건하는 MMPs의 내적인 길항제이다. MMPs와 TIMPs 사이의 불균형은 다양한 질병 상태와 관련되는데⁶¹⁾, 골관절염에서 혈액 내 MMP-9 생성량은 증가하고 이것이 골관절염에서 연골을 파괴하는데 기여한다고 알려져 있으나 어떤

연구에서는 골관절염 환자가 정상인보다 혈액 내 TIMP-1 생성량이 유의하게 증가하고 혈액 내 MMP-9 생성량은 오히려 정상인보다 낮았다는 결과도 있다^(62,63). Leukotriene은 여러 유형의 세포에서 지방산화효소(lipoxygenase) 경로에 의해 생성되는 아라키돈산(arachidonic acid) 유래 지질성 염증 매개체의 일종이다⁽⁶⁴⁾. PGE₂는 염증, 세포소멸, 혈관형성, 관절구조 변화를 일으키고 골관절염과 류마티스관절염에서 연골세포가 콜라겐을 생산하는 것을 억제하고 MMPs의 생산을 증가시켜서 연골의 분해를 촉진시킨다⁽⁶⁴⁾. LTB₄와 PGE₂는 관절염의 중요한 병인으로 작용하며 관절염에서 생성량이 증가하는데 LTB₄의 억제는 관절염을 치료하는데 도움이 된다^(66,67).

혈액 내의 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, BST 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고(Fig. 18), IL-6 생성량은 BST 투여군이 대조군에 비해 감소되었으며(Fig. 19), TNF- α 생성량은 BST 투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 20). 관절염 초기에는 연골세포에 대한 이화작용을 하는 IL-1 β , TNF- α 와 동화작용을 하는 IL-6의 생성량이 증가한다. BST 투여군에서는 연골세포에 대한 이화작용을 하는 IL-1 β 와 TNF- α 생성량이 감소하면서 동화작용을 하는 IL-6의 생성량도 상대적으로 감소하여 동화와 이화작용이 상대적인 균형을 이루게 되었다. 이와 같은 결과를 볼 때 BST 투여군은 염증 매개 인자의 생성을 억제하였다.

혈액 내의 TIMP-1 생성량을 측정한 결과, BST 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고(Fig. 21), MMP-9 생성량은 BST 투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 22). 관절염의 초기에 MMP-9가 증가하면 연골을 파괴하는 작용을 하며 그 후 TIMP-1도 증가하여 이것을 억제하는 작용을 하는데, 이 과정이 균형을 이루면서 점차 MMP-9와 TIMP-1 모두 감소하게 되었는데^(63,64), BST 투여군이 연골파괴를 억제했다고 할 수 있다.

혈액 내의 LTB₄ 생성량을 측정한 결과, BST 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고(Fig. 23), PGE₂ 생성량은 BST 투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 24). LTB₄는 염증매개체의 일종으로 관절염이 발생했을 때 생성량이 증가하고, PGE₂는 염증반응을 일으키고 연골분해를 촉진한다. BST 투여군에서 LTB₄와 PGE₂의 생성량이 감소한 것은 염증반응이 억제되고 연골 분해 작용이 감소되었다고 할 수 있다.

Micro CT-arthrography는 지주골지수를 분석하여 연골량을 측정하고, 연골하골판 두께, 골극 형성과 연골하골의 골흡수의 변화를 포함한 골관절염 소견을 평가할 수 있다⁽⁶⁸⁾. 무릎관절의 연골 파괴정도를 측정한 결과 BST 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되어 연골의 파괴가 억제되었다고 할 수 있다(Fig. 25).

무릎 관절내 활막세포의 변화 및 염증세포 침윤여부를 관찰하기 위하여 H&E 염색을 실시한 결과, BST 투여군은 대조군에 비해 연골조직과 활막조직, 섬유조직의 변형이 많이 억제되는 것으로 나타났으며(Fig. 26), 연골조직으로부터 proteoglycan 층을 잘 보존하여 연골 상태를 잘 관찰할 수 있는 Safranin-O 염색을 실시한 결과⁽⁶⁹⁾, 대조군에 비해 BST 투여군의 활막 주변에 빨간색으로 염색된 연골세포가 많이 분포되어 있어서 연골세포의 파괴가 억제되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 27).

이상의 실험 결과로 볼 때 附子瀉心湯은 항산화 작용과 골관절염의 병리 기전에 작용하는 염증 cytokine을 억제하는 항염증 효능이 있었다. 또한 염증반응을 촉진하고 파골작용이 있는 염증 매개 인자들의 생성을 유의하게 감소시켜 염증반응을 억제하고, 통증을 감소시키며, 관절연골을 보호하는 작용이 있으므로 골관절염에 대한 효과적인 치료제로 사용될 수 있다고 생각한다.

결론»»»»

附子瀉心湯이 산화적 손상, 염증 및 골관절염 동물병태 모델에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 중금속 검사 결과 납과 카드뮴의 경우 기준치 이하로 검출되었고 비소와 수은은 검출되지 않았다
2. 총 폴리페놀 함량은 높게 나타났다.
3. 세포 독성은 없었으며, 간과 신장 기능에도 영향을 미치지 않았다.

In vitro

1. DPPH와 ABTS 소거율은 농도 의존적으로 증가하였다.
2. ROS 생성량은 100 μ g/ml에서 유의성 있게 감소하였다.
3. NO와 IL-1 β 의 생성량은 감소했으나 유의성은 없었다.
4. IL-6은 10, 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있게 감소

하였고, TNF- α 는 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있게 감소하였다.

In vivo

1. 체중부하 측정에서 유의성 있게 증가하였다.
2. 총 백혈구수, 호중구, 림프구, 단핵구 생성량은 감소했으나 유의성은 없었다.
3. cytokine IL-1 β 와 TNF- α 생성량은 유의성 있게 감소하였고, IL-6 생성량은 감소했으나 유의성은 없었다.
4. 염증 매개 인자 TIMP-1, MMP-9, LTB₄, PGE₂ 생성량은 유의성 있게 감소하였다.
5. 연골량이 유의성 있게 증가하였으며, 연골의 염색결과 연골, 활막, 섬유조직의 변형이 억제되고 proteoglycan 함유량의 손실도 억제되었다.

이상의 결과로 보아 附子瀉心湯은 염증 cytokine을 조절하여 항산화, 항염증, 진통, 연골보호 작용이 있었으며, 골관절염을 진행시키는 인자를 효과적으로 억제하였다. 또한 활막, 연골, 섬유조직 등의 손상을 억제하여 관절과 관절주위조직을 보호하는 효능이 있어 골관절염 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

References

1. 한방재활의학과학회. 한방재활의학 제 3판. 서울:군자출판사. 2011:84-98.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학 제 6판. 서울:최신의학사. 2006:253-61.
3. 한태륜, 방문석 외 57인. 재활의학 제 3판. 서울:군자출판사. 2009:905-36.
4. 張介賓. 景岳全書 上. 서울:대성문화사. 1988:229-34.
5. Kim YE, Kim EJ. 저출력 레이저 요법이 흰쥐의 콜라겐 유발 관절염에 미치는 항염증 효과. 동의생리병리학회지. 2011; 25(5):870-5.
6. Kim SH, Na JY, Song KB, Choi DS, Kim JH, Kwon YB, Kwon JK. 흰쥐 관절연골세포에서 과산화수소로 유도된 산화 스트레스에 대한 진세노사이드 Rb₁의 보호 효과. 고려인삼학회지. 2012;36(2):161-8.
7. 이성규, 이은주, 박우동, 김중부, 최상원. 한방처방제 추출물의 항산화 및 항염증 활성. 한국식품과학회지. 2011; 43(5):624-32.
8. 박동수, 정수현, 김순중, 서일복. 加減小續命湯이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염의 초기변화에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2011;21(4):49-65.
9. 이정민, 홍서영, 오민석. Papain으로 유도된 골관절염 생쥐 모델에서 芍藥甘草附子湯의 항골관절염 효능에 관한 연구. 대한한의학회지. 2013;34(1):116-35.
10. 장효길, 허동석. 麻黃附子湯이 Papain으로 유도된 골관절염 생쥐 모델에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2012; 22(4):59-77.
11. 공상은, 오민석. Papain으로 유도된 골관절염 생쥐 모델에서 四逆湯의 항골관절염 효능에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2013;27(2):212-24.
12. 박동수, 김순중, 정수현, 서일복. 蠲痺湯이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염의 초기변화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2011;25(1):84-91.
13. 신예지, 백용현, 박동석, 김재규, 고희균. 퇴행성 관절염에 대한 獨活, 升麻 복합처방의 대사조절을 통한 연골보호 효과. 대한침구학회지. 2010;27(4):39-53.
14. 최재영, 오민석. 甘草附子湯이 Papain으로 유도된 골관절염에 미치는 실험적 연구. 한방재활의학과학회지. 2012; 22(4):37-57.
15. 성영석, 최학주, 오정민, 지중구, 박지원, 김동희. 乾薑附子湯이 papain으로 誘導된 骨關節炎 생쥐 모델에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2012;21(1):33-52.
16. 박동수, 정수현, 김순중, 서일복. 蜂毒藥鍼이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염 통증 모델에서 중추신경내 NOS, C-fos, Serotonin, Substance P 발현에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2007;17(3):1-18.
17. 강미숙, 백성욱, 김갑성. 楡根皮藥鍼液이 생쥐의 두개골 파골세포에서 골재흡수의 저해에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008;25(2):119-27.
18. 김현수, 서일복, 박세근, 김정선, 서정철, 최선미, 구성태, 김이화. 秦芫藥鍼이 collagenase로 유도된 흰쥐 골관절염 모델에서 NOS 발현에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2006;23(1):87-94.
19. 송계화, 이진석, 조진형, 박기범. 紫河車藥針의 退行性 膝關節炎 治療에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2006; 23(4):163-73.
20. 김용문, 김순중, 서일복. 蜂毒藥鍼이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(5):1154-62.
21. 박동석. 땅두릅藥鍼의 연골보호와 Apoptosis 억제에 대한 효과. 대한한의학회지. 2007;28(4):114-23.
22. 이태호, 이은용. 絡石藤藥鍼이 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2009;26(6):51-65.
23. 김환영, 최진봉. 蜂毒藥鍼과 鹿茸藥鍼이 MIA 유도 골관절염 흰쥐에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2010; 20(1):61-77.
24. 김은정, 김계엽. 蜂毒을 이용한 흰쥐 연골세포에서의 염증성 cytokine 생성 조절. 동의생리병리학회지. 2011;25(1): 132-7.
25. 박영배, 강성길, 김혜경. 施灸方法이 Adjuvant 관절염 흰쥐의 혈액에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1995;11(2):137-50.
26. 서병관, 박동석, 백용현. Collagenase-induced Arthritis Rat Model에서 Thermal Hyperalgesia에 대한 전침의 진통효과 및 기전연구. 대한침구학회지. 2011;28(2):57-67.
27. 채인식. 傷寒論譯註. 서울:고문사. 1971:123, 129.

28. 문준전, 안규석, 최승훈. 동의병리학. 서울:고문사. 1990: 397-8.
29. 전국한의과대학 본초학 공동교재편찬위원회. 본초학 개정판. 서울:영림사. 2010:216-21, 283-5, 372-4.
30. 이승인. 古方撰次. 부산:교정의서국. 2008:166.
31. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986;29(8):1039-49.
32. Iannone F, Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res*. 2003;15(5):364-72.
33. 배병철 역. 今釋黃帝內經素問. 서울:성보사. 1994:376-82.
34. 김태은, 윤여민, 박용인, 김윤석, 전병훈, 김명동. 한약재 물 추출물의 생리활성 검색 및 MPTP-유도 신경독성에 대한 大黃의 보호효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(6):1666-85.
35. 오성준, 백남인, 김혜영. 大黃(Rheum undulatum L.) 뿌리의 항산화 활성물질, Piceatannol. *한국응용생명화학학회지*. 2001;44(3):208-10.
36. 장연희, 최상원, 조성희. 고지방식이 급여 흰쥐에서 大黃 및 大黃錠劑丸의 혈청 지질 개선 효과. *한국영양학회지*. 2008;41(1):5-12.
37. 이종철, 김경준. 大黃의 Elastase 활성 억제와 Tyrosinase 억제연구. 한방안이비인후과피부과학회지. 2009;22(3):36-46.
38. 이종근, 송윤경, 임형호. 黃芩의 진통효과와 항염효과. *대한한의학회지*. 2007;28(4):124-35.
39. 윤석빈, 한효상, 이영중. 黃芩이 LPS로 유발된 RAW 264.7 Cells의 염증인자에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2011;26(2):75-81.
40. 김태균, 안효초, 윤미영, 임재윤, 채병숙, 김대근, 박병현, 양재현. 콜라겐으로 유발된 관절염에 대한 피록시감 및 黃芩 가수분해물 복합 히드로겔의 항염 효과. *약학회지*. 2008;52(5):394-401.
41. 신정민, 박찬경, 신은주, 조태형, 황인경. 黃芩 추출물이 조골세포와 파골세포의 활성화에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 2008;40(6):674-9.
42. 김용주, 이문조, 박진우, 김준기, 최달영, 김철호. 黃連 열수추출물의 항산화 활성 효과. *생명과학회지*. 2000;10(3):241-6.
43. 정효원, 박용기. 黃連의 쥐 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 TNF- α 의 생성억제효과. *대한본초학회지*. 2006;21(2):165-73.
44. 윤광로, 김영진, 이은, 이준무. 黃連의 항염증효과. *대한본초학회지*. 2009;24(3):79-86.
45. Cho JY, Park JS, Kim PS, Chae SH, Yoo ES, Baik KU, Lee JS, Park MH. 지질다당류-유도 RAW264.7 세포 내 종양 괴사인자 생성에 미치는 한방의 억제효과. *Natural Product Sciences*. 1999;5(1):12-9.
46. 김윤희, 임윤경, 이현. 附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. *대한경락경혈학회지*. 2006;23(2):137-54.
47. 정선희, 박동석. 附子藥鍼이 鎮痛 및 消炎作用에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 1997;14(1):334-46.
48. 박선민, 유동열. 三氣飲加味方이 파골세포의 분화 및 조골세포의 활성화에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2012;25(2):23-42.
49. 조은호, 이태희. LPS에 의해 유발된 염증 스트레스에 대한 黃連과 附子の 효과. *대한본초학회지*. 2006;21(2):77-85.
50. 대한임상병리학회. 임상병리학 제 3판. 2001:71-106.
51. Kalben DA, Blum U. Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthritis. *Arzneimittelforschung*. 1977;27(3):527-31.
52. 이용수. Monosodium iodoacetate(MIA)로 유발된 관절염 흰쥐의 행동학적 조직학적 변화. *고려대학교 대학원*. 2008:1-13.
53. 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.
54. Zhu CZ, Wilson SG, Mikusa JP, Wismer CT, Guavin DM, Lynch JJ. Role of central and peripheral mGluR5 receptors in post-operative pain in rats. *Pain*. 2005;114:195-202.
55. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*. 1988;241(4865):585-9.
56. Sidney LE, Kirkham GR, Buttery LD. Comparison of osteogenic differentiation of embryonic stem cells and primary osteoblasts, revealed by responses to IL-1 β , TNF- α and IFN- γ . *Stem Cells Dev*. 2014;23(6):605-17.
57. Hughes FJ, Buttery LD, Hukkanen MV, O'Donnell A, Maclof J, Polak JM. Cytokine-induced prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase-2 activity are regulated both by a nitric oxide-dependent and -independent mechanism in rat osteoblasts in vitro. *J Biol Chem*. 1999;274(3):1776-82.
58. Iking-Konert C, Bartz-Bazzanella P, Falagan D, Hofman MW, Schwarting A, Dörner T. Interleukin-6 inhibition as a potential therapeutic target in rheumatic diseases. *Z Rheumatol*. 2014;73(3):269-76.
59. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014;141(2):125-39.
60. Farina AR, Cappabianca L, Di Ianni N, Ruggeri P, Ragone M, Merolle S, Gulino A, Mackay AR. Alendronate promotes plasmin-mediated MMP-9 inactivation by exposing cryptic plasmin degradation sites within the MMP-9 catalytic domain. *FEBS Letters*. 2012;586(16):2366-74.
61. Kim YS, Kim SH, Kang JG, Ko JH. Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB reports*. 2012;45(11):623-8.

62. Lipari L, Gerbino A. Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) in human articular cartilage. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):817-23.
63. Naito K, Takahashi M, Kushida K, Suzuki M, Ohishi T, Miura M, Inoue T, Nagano A. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology*. 1999;38(6):510-5.
64. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;33(3):155-67.
65. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular IMMUNOLOGY seventh edition, 세포분자면역학 교재연구회 역. 세포분자면역학. 서울:범문에듀케이션. 2013:537.
66. Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(7):2030-40.
67. Atik OS. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 1990;39(4):253-4.
68. Kwon JW, Kang HS, Hong SH. Micro-CT Arthrographic Analysis of Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rat Knees. *J Korean Soc Radiol*. 2010;62(5):483-490.
69. Király K, Lammi M, Arokoski J, Lapveteläinen T, Tammi M, Helminen H, Kiviranta I. Safranin O reduces loss of glycosaminoglycans from bovine articular cartilage during histological specimen preparation. *Histochem J*. 1996;28(2):99-107.