朮附湯 추출물의 항산화 및 항염증에 대한 효과

형균* · 원제훈[†] · 우창훈*

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실*, 동국대학교 경주한의원 한방재활의학과[†]

Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of *Chulbu-tang*

Kyun Hyeong, K.M.D.*, Je-Hoon Won, K.M.D.[†], Chang-Hoon Woo, K.M.D.*

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University*,
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Gyeongju Oriental Medicine Clinic[†]

RECEIVED June 13, 2020

ACCEPTED June 26, 2020

CORRESPONDING TO

Chang-Hoon Woo, Department of
Rehabilitation Medicine of Korean
Medicine, College of Korean
Medicine, Daegu Haany University,
Pohang Korean Medical Hospital,
411 Saecheonbyeon-daero,
Nam-gu, Pohang 37685, Korea

TEL (054) 271-8006

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net.

Copyright © 2020 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives Even though the various alternative herbal medicine has applied for osteoarthritis (OA) treatment, its scientific proof remains uncertain. The aim of the present study evaluates the effects of *Chulbu-tang* on inflammatory responses in a mono-sodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model.

Methods OA rat model was established by MIA injection in intra-joint of rats. 7 days after, OA rats except OA control rats were administrated *Chulbu-tang* (100 or 200 mg/kg) or Indomethacin (5 mg/kg) once a day for 14 days. The weight-bearing ability of hind paws were measured when group isolation 0, 7, and 14 days. Western blotting was performed to examine the knockdown/overexpressing efficiency of *Chulbu-tang*. In addition, cartilage destruction was measured histologically.

Results *Chulbu-tang* treatment significantly reduced the protein expressions of inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2, and inhibited inflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)-1 β , and IL-6 through nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inactivation. Moreover, anti-oxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1/2 through nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway significantly increased. Our findings indicate that *Chulbu-tang* has the potential therapeutic effect on OA through inhibiting the inflammatory responses via inactivating NF- κ B signaling pathway. In addition, upregulation of Nrf2 led to anti-oxidant effects.

Conclusions Taken together, *Chulbu-tang* is believed to have antioxidant, anti-inflammatory effects, and cartilage protection for arthritis-causing rats. (*J Korean Med Rehabil* 2020;30(3):71-87)

Key words Iodoacetic acid, Osteoarthritis, *Chulbu-tang*, Antioxidants, Anti-inflammatory agents

서론»»»

골관절염(osteoarthritis, OA)은 관절을 지속적으로 사용하기 때문에 관절 연골이 닳아 없어지고 이로 인해 관절 연골과 연골하골의 소실을 야기하는 관절 염증질

환 중 하나이다¹⁾. 퇴행성 관절염으로도 불리는 골관절염의 증상으로는 만성적이고 지속적인 관절의 통증, 관절액 삼출, 관절 연골의 부분적이고 점진적인 소실, 그리고 이와 동반해서 윤활막과 연골하골의 2차적인 변화가 특징적으로 나타나며²⁾, 그 원인은 확실하게 밝혀지

지 않았으나 노화, 비만과 같은 과중한 무게 지지, 관절의 외부적 손상 이력 등을 주요 요인으로 들 수 있다^{3,4)}.

서양의학에서 골관절염의 치료는 통증 완화나 연골 손상 억제 및 골관절염 진행의 지연을 목적으로 하며 진통제, 코티코스테로이드, 비스테로이드성 항염증제의 경구 투여 및 국소 패치, 관절강 내 하이알루론산 주사 등이 주로 사용되고 있다^{5,6)}. 하지만 이러한 약물의 장기적이고 반복적인 사용은 소화기 장애,腎 장애, 관절 연골의 변성 촉진, 혈액 응고 장애, 주사 부위의 2차 감염 등의 전신 부작용을 야기시킬 수 있기에 치료 시 제한적인 사용이 요구된다⁷⁻⁹⁾. 따라서 효과적이면서 부작용 없이 안전한 골관절염의 새로운 치료제 개발이 요구되는 실정이다.

골관절염의 한의학적 진단은 痺證에 해당한다. 痺症은 外邪 중 주로 風寒濕의 三氣가 經絡으로 침입, 關節에 응체됨으로써 血氣運行을 원활하지 못하게 하여 關節, 肌肉 및 筋骨에 疼痛, 麻木 및 重着을 일으키고 심하면 관절의 변형을 유발한다¹⁾.

한의학에 있어서 골관절염에 대한 연구는 침구, 약침 치료, 약물 치료, 물리적 요법 등 다양한 방면으로 이뤄지고 있으며, 이러한 치료들은 연골 보호, 연골 세포의 재생, 관절 운동 개선, 통증 억제 등의 효과를 준다고 보고되고 있다^{10,11)}.

尢附湯은 白尢, 炮附子, 炒杜仲, 生薑으로 구성된 처방으로 국내 의서 중에서는 東醫寶鑑의 外形篇 卷2의 腰痛 중, 濕氣에 상하여 허리가 무겁고 시린 것을 치료한다고 되어 있다¹²⁾. 白尢의 항염증 효과¹³⁾, 附子の 항염증 작용¹⁴⁾, 杜仲의 항산화 효과¹⁵⁾, 生薑의 염증 억제 효과¹⁶⁾ 등 尢附湯을 구성하고 있는 각각의 약재들의 항산화 및 항염증에 대한 효과는 다양한 연구가 있으나, 복합제제인 尢附湯의 항산화 및 항염증 효능에 대한 연구는 아직 없기에 본 연구를 시작하게 되었다.

Monosodium iodoacetate (MIA)를 사용하여 골관절염을 유발시킨 rat에 尢附湯을 투여하고 뒷다리 체중 부하 검사, 관절 조직 내 항산화, 항염증 단백질 분석, 연골의 조직병리학적 검사 등을 실시하고 유의성 있는 결과를 도출하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 동물

골관절염 유발에 사용한 쥐는 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입한 웅성 Sprague-Dawley rat (200~250 g, 7주령)으로 실험에 들어가는 당일까지 고형 사료 (Samyang corporation, Wonju, Korea)와 물을 자유롭게 공급받았다. 사육실의 온도와 습도는 각각 22±2°C, 55±5%로 유지하였고 명암주기를 12시간으로 조절하여 일주일간 적응시킨 후 본 실험에 투입되었다. 또한 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(DHU2019-097)을 받아 동물 실험을 진행하였다.

2) 약재 및 시료 추출

본 실험에서 사용된 尢附湯은 『東醫寶鑑』¹²⁾에 근거하여 웅기한약국(Daegu, Korea)에서 구입하여 적절한 선별과정을 거쳐 사용하였으며 1첩당 분량은 Table I과 같다. 尢附湯 4첩에 해당하는 91 g에 증류수 910 mL를 넣고 열탕 추출기에서 2시간 가열하여 얻은 추출액을 여과지로 여과하였다. 여과된 용액을 50°C에서 감압 농축기로 농축한 후 동결건조하여 尢附湯 분말(CBT)을 12.5 g 얻었으며(수득율 13.74%), CBT는 -80°C에서 냉동보관하였다가 실험 직전에 녹여서 사용하였다.

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 MIA, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT)은 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Indomethacin은 SK케미칼 J200 (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 마취제 Zoletile mixture는 Vibrac (Carros, France)에서 구

Table I. Composition and Amount of Chulbu-tang

Pharmacognostic name	Amount (g)
<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	7.5
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	7.5
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	3.75
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	4
Total amount	22.75

입하였다.

1차 항체 p22^{phox}, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), inhibitory kappa B- α (I κ B- α), heme oxygenase-1 (HO-1), catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2)와 nuclear factor-kappa Bp65 (NF- κ Bp65), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 cyclooxygenase 2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), phosphorylated inhibitor of κ B α (p-I κ B α), histone, β -actin 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 또한, anti-reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4)는 LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, USA)에서 구입하였다. 그리고 protease inhibitor와 ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였으며, Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents와 nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, IL, UK)에서 구입하여 실험에 사용하였다. BCA protein assay kit는 단백질을 정량하기 위해 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

4) 실험기기

본 실험에서는 열탕추출기(DWT-1800T; 대웅, Seoul, Korea), vortex mixer, rotary vacuum evaporator (Buchi B-480; Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), 냉장고속원심분리기 (Mega17R; 한일과학, Daejeon, Korea), 동결건조기(FD5508; 일신엔지니어링, Siheung, Korea) 전자체중계(카스전자 저울, Yangju, Korea), Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25; Linton Instrument Co., Palgrave Diss, UK), tissue grinder (Bio Spec Product, Bartlesville, OK, USA), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 항산화능 측정

(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거율
추출한 ⚡附湯의 free radical 소거능 분석을 위해 DPPH

법을 활용하였다¹⁷⁾. 60 μ M DPPH 용액(100 μ L)과 ⚡附湯을 농도별로 잘 희석한 용액 (100 μ L)을 혼합하여 37°C 실온의 암실에 30분간 두었다가 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)로 흡광도 540 nm에서 측정하였으며, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

DPPH free radical 소거능 (%)

$$= \{ (OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{control}} \} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않은 경우 흡광도

OD_{sample}: 시료가 들어간 경우 흡광도

(2) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) 소거율

추출한 ⚡附湯의 항산화 효능을 평가하기 위해 ABTS free radical 소거능을 활용하였다¹⁸⁾. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 잘 혼합한 후 실온의 암소에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 흡광도 415 nm에서 0.70 (± 0.02)가 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액(95 μ L)에 ⚡附湯 5 μ L를 가하여 15분간 방치한 후 microplate reader (Infinite M200 pro)로 흡광도를 측정하였으며, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

ABTS free radical 소거능 (%)

$$= \{ (OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{control}} \} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않은 경우 흡광도

OD_{sample}: 시료가 들어간 경우 흡광도

2) 약물투여와 군 분리

실험군은 각 군당 7마리씩 5개의 군으로 나누었으며, indomethacin과 ⚡附湯은 증류수에 녹여 2주동안 매일 오전 정해진 시간에 경구로 투여하였다.

- ① 정상군(Normal): 골관절염을 유발하지 않고 아무런 처치를 하지 않음.
- ② 대조군(Control): MIA로 골관절염을 유발하고 증류수를 경구 투여함.
- ③ Indomethacin 투여군(Indo): MIA로 골관절염을 유발한 후 indomethacin 5 mg/kg 경구 투여함.
- ④ ⚡附湯 저농도 투여군(CBTL): MIA로 골관절염을

유발한 후 尢附湯 100 mg/kg 경구 투여함.

- ⑤ 尢附湯 고농도 투여군(CBTH): MIA로 골관절염을 유발한 후 尢附湯 200 mg/kg 경구 투여함.

3) 실험동물 골관절염 유발

마취제 Zoletile mixture 3.5 mg/kg을 복강 투여하여 rat을 마취시킨다. 오른쪽 무릎 관절낭 주변을 깨끗이 세정한 후 인슐린 주사기(BD 31 G; BD Medical-Diabetes Care, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 골관절염 유도 물질인 MIA를 오른쪽 무릎 관절강 안에 50 μ L (80 mg/mL) 씩 투여하였다. MIA 투여 일주일 후에 골관절염이 유발되었는지 확인한 후 골관절염이 유발된 rat만을 선별하였다.

4) 체중, 식이섭취량, 식이효율 측정

Rat의 체중은 전자체중계로 2일 간격으로 1번씩 동일한 시간과 동일 조건에서 측정하였고, 실험 종료일 체중과 실험 개시 전 체중의 차이를 계산하여 체중 증가량(body weight gain)을 산출하였다. 식이섭취량은 2일간 제공된 식이에서 섭취하고 남은 식이량을 제하여 각 실험군의 하루 식이섭취량을 계산하였고 각 rat의 체중 증가량을 동일 사육기간의 식이섭취량으로 나누어 식이효율(%; food efficiency ratio, FER)을 산출하였다.

(1) 체중(body weight)

- ① 체중 변화: 2일 간격으로 1회 측정, 오전 동일한 시간에 체중 측정/체중 기록
② 총 체중 증가량: Final body weight (g) - Initial body weight (g)

(2) 식이효율(FER)

식이효율(%) = 총 체중 증가량/총 식이 섭취량 $\times$ 100

5) 체중 부하 검사

尢附湯은 오전에 경구 투여하고 뒷다리 체중 부하 측정은 오후에 하였다. 측정일은 尢附湯을 경구 투여한 후 7일과 14일에 각각 진행하였다. Incapacitance tester를 사용하여 자연스럽게 서 있을 때 오른쪽과 왼쪽 발 무게를 측정하였다. MIA에 의해 골관절염이 유도되면 rat은 MIA를 투여하지 않은 왼쪽 발에 의지하여 tester의 holder 안에 서 있게 된다. 이때 왼쪽과 오른쪽 각각의 발 무게(g)를 측정하여 산출하였다. 실험 결과는 골

관절염이 유도된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량에 대한 왼쪽 뒷다리(정상 뒷다리)의 체중 부하량을 구한 후 체중 부하 비율을 평가하고, 정상군을 100으로 했을 때 각 실험군의 체중 부하 비율을 산정하여 mean (%) $\pm$ standard derivation (SD)로 나타내었다.

$$\text{체중 부하 비율} = \frac{\text{정상 뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}}$$

$$\text{상대적 체중 부하} = \frac{\text{각군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의 체중 부하 비율}} \times 100$$

6) 단백질 발현량 분석

세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl_2 , 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose를 추가하고 0.1 M DTT와 protease inhibitor를 추가한 뒤 buffer A를 넣고 tissue grinder로 분쇄한 후 NP-40 (10%) 용액을 추가하였다. 얼음 위에서 20분 동안 방치한 후 12,000 rpm의 속도로 2분정도 원심 분리하여 세포질이 함유된 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 NP-40 (10%)이 추가된 buffer A에 2회 씻어내고 100 μ L의 buffer C (10% glycerol, 50 mM HEPES, 0.1 mM PMSF, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.3 mM NaCl)를 추가하여 다시 부유시킨 후 10분마다 vortex을 3회 실시하였다. 4°C에서 12,000 rpm의 속도로 10분 간격으로 원심 분리한 후 핵이 함유된 상층액을 얻었다. 획득한 세포질과 핵은 -80°C에서 냉동 보관하였다. 관절 조직의 세포질의 NOX4, p22^{phox}, p-IkBa, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, HO-1, SOD, GPx-1/2, catalase, β -actin 및 핵의 NF- κ Bp65, Nrf2와 Histone 단백질의 발현을 평가하기 위해 8-15% SDS- polyacrylamide gel을 만들어 10 μ g의 단백질을 전기영동 하여 acrylamide 겔에서 nitro-cellulose membrane으로 이동시켰다. 전기 영동된 membrane에 보고자하는 1차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight시켰으며, 그 후 PBS-T로 8분마다 6회 행구고, 1차 항체에 적합한 2차 항체(PBS-T로 1:5,000으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후, PBS-T로 8분마다 5회 세척하였다. 그리고 ECL solution (GE Healthcare, Chicago, IL, UK)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 해당 단백질 발현을 확인한 후, 발현된 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 이용하

여 정량하였다. 각 군의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나누어 결과값을 산출하였다.

7) 조직 병리학적 분석

부검 후 오른쪽 관절조직을 절단하여 10% 포르말린 용액에 넣어 관절을 탈회시키고 탈회 유무를 평가하기 위하여 radiographic technique을 적용하였다. 탈회된 관절조직을 파라핀 왁스에 넣고 고정시킨 다음 coronal section을 진행하였다. 고정된 조직을 7 μm 로 자르고 Hematoxylin & Eosin (H&E)과 Safranin-O 염색을 시행한 후 현미경을 통해 관절 조직의 상태를 관찰하였다. H&E 염색 결과로 염증 유무나 활막 세포의 증식 그리고 염증 세포의 조직으로의 침윤 여부를 확인할 수 있으며, Safranin-O 염색 결과로 proteoglycan층을 염색하여 연골 조직의 손상 유무를 관찰할 수 있다.

8) 통계처리

모든 실험 수치는 mean $\pm$ SD 및 mean $\pm$ standard error of mean으로 나타냈으며, SPSS program for Windows version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL USA)를 이용하여 one-way analysis of variance로 검정을 실시하였으며, 통계적 유의성의 평가는 Dunnett's multiple comparison test로 검증하였다. 정상군과 대조군 그리고 대조군과 약물 투여군 사이의 통계적 유의성을 p-value가 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»»

1. 항산화에 미치는 효과

1) DPPH 라디칼 소거 활성

CBT의 DPPH free radical 소거능을 분석한 결과, DPPH 소거능이 농도 의존적으로 증가하였다. DPPH 소거능을 IC₅₀값으로 나타낼 때 285.41 $\pm$ 1.11 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Fig. 1).

2) ABTS 라디칼 소거 활성

CBT의 ABTS free radical 소거능을 분석한 결과, ABTS 소거능이 농도 의존적으로 증가하였다. ABTS 소거능을 IC₅₀값으로 나타낼 때 339.62 $\pm$ 0.70 $\mu\text{g/mL}$ 이다(Fig. 2).

2. 체중 및 식이효율에 미치는 효과

실험기간에 측정된 체중의 변화는 정상군 45.4 $\pm$ 8.6, 대조군 46.0 $\pm$ 5.1, Indo 49.3 $\pm$ 12.5, CBTL 35.0 $\pm$ 2.6, CBTH 46.3 $\pm$ 2.5로 나타났다. MIA 유발 후 14일간의 체중 측정에서 모든 실험군에서 체중이 증가하였으며 각 실험군 간의 유의성은 보이지 않았다(Table II, Fig. 3).

식이효율은 정상군 17.8 $\pm$ 3.6, 대조군 18.1 $\pm$ 1.7, Indo 19.4 $\pm$ 5.2, CBTL 13.8 $\pm$ 1.0, CBTH 18.2 $\pm$ 1.0으로 나타났으며, 각 실험군 간의 유의성은 보이지 않았다(Table III, Fig. 4).

Fig. 1. Scavenging activity of CBT on DPPH free radical. (A) DPPH free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) DPPH free radical scavenging activity of CBT. All values are mean $\pm$ standard error of mean of triplicate experiments. CBT: Chulbu-tang, DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Table II Body Weight Change of the Experimental Groups

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight change (g)
Normal	314.7±5.0	349.3±7.8	45.4±8.6
Control	295.1±8.1	355.9±3.4	46.0±5.1
Indo	297.7±4.2	347.0±13.3	49.3±12.5
CBTL	304.2±9.0	339.2±8.2	35.0±2.6
CBTH	300.1±2.1	346.4±3.2	46.3±2.5

Results are mean±standard derivation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

Fig. 2. Scavenging activity of CBT on ABTS free radical. (A) ABTS free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) ABTS free radical scavenging activity of CBT. All values are mean±standard error of mean of triplicate experiments. CBT: *Chulbu-tang*, ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid).

Fig. 3. Body weight changes. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

Fig. 4. Food efficiency ratio of the experimental groups. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

Table III Food Intakes, Body Weight Change, Food Efficiency

Group	Food intakes (g/day)	Body weight change (g/day)	Food efficiency ratio (%)
Normal	28.3±6.3	5.0±1.0	17.8±3.6
Control	27.3±1.7	5.1±0.5	18.1±1.7
Indo	22.1±0.7	5.5±1.5	19.4±5.2
CBTL	23.4±1.9	3.9±0.3	13.8±1.0
CBTH	22.4±1.0	5.1±0.3	18.2±1.0

Results are mean±standard derivation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

Table IV. The Relative Changes of Hind Paw Weight Distribution

Group	0 day	7 days	14 days
Normal	100±7.21	100±2.85	100±4.86
Control	258.04±50.87 ^{##}	194.60±26.34 ^{##}	189.50±18.37 ^{###}
Indo	231.14±26.76	165.70±8.50	156.70±6.12
CBTL	226.31±16.57	135.12±8.95	176.76±13.84
CBTH	229.29±23.50	142.34±13.79	166.56±7.58

Results are mean±standard derivation (n=7/group).

Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 vs Normal.

3. 뒷다리 체중 부하에 미치는 효과

각 실험군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 분석한 결과는 다음과 같다. 정상군을 100으로 환산했을 때 MIA 투여 일주일 후에는 대조군 194.60±26.34, Indo 165.70±8.50, CBTL 135.12±8.95, CBTH 142.34±13.79로 나타났으며 정상군과 대조군에서만 유의한 차이를 보였다. 또한, 2주 후에는 대조군 189.50±18.37, Indo 156.70±6.12, CBTL 176.76±13.84, CBTH 166.56±7.58로 나타났으며 정상군과 대조군에서만 유의한 차이를 보였다. 하지만 대조군에 비해 약물투여군 모두에서 뒷다리 체중 부하가 감소되었으나 유의한 차이는 없었다 (Table IV, Fig. 5).

Fig. 5. The relative changes of hind paw weight distribution. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 vs Normal.

4. 관절조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 분석

1) NOX4

NOX4의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.06 , 대조군 1.39 ± 0.07 ($p < 0.01$), Indo 1.03 ± 0.10 ($p < 0.01$), CBTL 0.96 ± 0.10 ($p < 0.01$), CBTH 0.95 ± 0.09 ($p < 0.01$)로 나타나 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

2) p22^{phox}

p22^{phox}의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.06 , 대조군 1.18 ± 0.03 ($p < 0.05$), Indo 0.95 ± 0.06 ($p < 0.01$), CBTL 0.93 ± 0.14 , CBTH 0.94 ± 0.10 ($p < 0.05$)으로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

5. 관절조직 내 항산화 단백질 분석

1) Nrf2

Nrf2의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.05 , 대조군 0.73 ± 0.02 ($p < 0.001$), Indo 0.86 ± 0.04 ($p < 0.05$), CBTL 0.90 ± 0.08 , CBTH 0.87 ± 0.04 ($p < 0.05$)로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

Fig. 6. Effects of *Chulbu-tang* on NOX4 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). NOX4: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ##p<0.01 vs. Normal and **p<0.01 vs. Control.

2) HO-1

HO-1의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.13 , 대조군 0.60 ± 0.06 ($p < 0.05$), Indo 0.89 ± 0.13 , CBTL 0.67 ± 0.12 ,

Fig. 7. Effects of *Chulbu-tang* on p22^{phox} expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. #p<0.05 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Fig. 8. Effects of *Chulbu-tang* on Nrf2 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Nrf2: nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ##p<0.01 vs. Normal and *p<0.05 vs. Control.

CBTH 0.72 ± 0.10 으로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 증가하는 경향을 보였다(Fig. 9).

3) SOD

SOD의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.04 , 대조군 0.67 ± 0.03 ($p < 0.001$), Indo 0.97 ± 0.07 ($p < 0.01$), CBTL 0.80 ± 0.04 ($p < 0.05$), CBTH 0.80 ± 0.04 ($p < 0.05$)으로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

4) Catalase

Catalase의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.07 , 대조군 0.75 ± 0.04 ($p < 0.05$), Indo 0.93 ± 0.07 , CBTL 0.79 ± 0.03 , CBTH 0.84 ± 0.04 로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 11).

5) GPx-1/2

GPx-1/2의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.09 , 대조군 0.54 ± 0.04 ($p < 0.001$), Indo 0.87 ± 0.09 ($p < 0.01$), CBTL 0.80 ± 0.08 ($p < 0.05$), CBTH 0.83 ± 0.09 ($p < 0.05$)로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 증가하였다(Fig. 12).

Fig. 9. Effects of *Chulbu-tang* on HO-1 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). HO-1: heme oxygenase-1, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. [#] $p < 0.05$ vs. Normal.

6. 관절조직 내 염증성 단백질 분석

1) p-IκBα

p-IκBα의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00 ± 0.01 , 대조군 1.30 ± 0.11 ($p < 0.05$), Indo 0.92 ± 0.07 ($p < 0.05$), CBTL

Fig. 10. Effects of *Chulbu-tang* on SOD expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). SOD: superoxide dismutase, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ^{###} $p < 0.001$ vs. Normal and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Control.

Fig. 11. Effects of *Chulbu-tang* on catalase expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. [#] $p < 0.05$ vs. Normal.

Fig. 12. Effects of *Chulbu-tang* on GPx-1/2 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). GPx-1/2: glutathione peroxidase-1/2, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Fig. 13. Effects of *Chulbu-tang* on p-IκBα expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). p-IκBα: phosphorylated inhibitor of κBα, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. #p<0.05 vs. Normal and *p<0.05 vs. Control.

1.08±0.09, CBTH 0.99±0.07 (p<0.05)로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 13).

2) NF-κBp65

NF-κBp65의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.05, 대조군 1.34±0.05 (p<0.001), Indo 1.05±0.06 (p<0.01), CBTL 1.11±0.07 (p<0.05), CBTH 1.12±0.05 (p<0.01)로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 14).

7. 염증성 매개인자에 미치는 효과

1) COX-2

COX-2의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.04, 대조군 1.24±0.04 (p<0.001), Indo 0.92±0.07 (p<0.01), CBTL 1.11±0.08, CBTH 1.08±0.05 (p<0.05)으로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 15).

2) iNOS

iNOS의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.08, 대조군 1.43±0.08 (p<0.001), Indo 0.94±0.11 (p<0.01), CBTL

Fig. 14. Effects of *Chulbu-tang* on NF-κBp65 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). NF-κBp65: nuclear factor-kappa Bp65, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

1.07±0.12 (p<0.05), CBTH 0.93±0.15 (p<0.05)로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 16).

Fig. 15. Effects of *Chulbu-tang* on COX-2 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). COX-2: cyclooxygenase 2, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Fig. 16. Effects of *Chulbu-tang* on iNOS expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). iNOS: inducible nitric oxide synthase, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

8. 염증성 cytokine 발현에 미치는 효과

1) TNF-α

TNF-α의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.07, 대조군 1.16±0.01 (p<0.05), Indo 1.01±0.07 (p<0.05), CBTL

Fig. 17. Effects of CBT on TNF-α expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). TNF-α: tumor necrosis factor alpha, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. #p<0.05 vs. Normal and *p<0.05 vs. Control.

0.92±0.08 (p<0.05), CBTH 0.86±0.10 (p<0.05)으로 대조군에 비해 CBTL과 CBTH에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 17).

2) IL-6

IL-6의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.10, 대조군 1.54±0.09 (p<0.01), Indo 1.15±0.10 (p<0.05), CBTL 1.11±0.17, CBTH 0.99±0.14 (p<0.05)로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 18).

3) IL-1β

IL-1β의 발현을 분석한 결과, 정상군 1.00±0.08, 대조군 1.27±0.11 (p<0.01), Indo 1.05±0.11, CBTL 0.88±0.16, CBTH 0.90±0.12 (p<0.05)로 대조군에 비해 CBTH에서 유의하게 감소하였다(Fig. 19).

9. 조직병리학적 변화에 미치는 효과

1) H&E staining

손상을 입은 연골 조직의 회복 정도를 확인하기 위해 H&E 염색을 실시한 결과, 활막 조직과 연골이 정상 상태를 보인 정상군에 비하여 대조군에서는 골관절염이

Fig. 18. Effects of *Chulbu-tang* on IL-6 expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). IL-6: interleukin-6, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ^{##}p<0.01 vs. Normal and ^{*}p<0.05 vs. Control.

Fig. 19. Effects of *Chulbu-tang* on IL-1β expression. Results are mean±standard derivation (n=7/group). IL-1β: interleukin-1 β, Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate. ^{##}p<0.01 vs. Normal and ^{*}p<0.05 vs. Control.

Fig. 20. Histological observation on joint (Hematoxylin & Eosin staining, ×100). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

유발되어 연골 표면이 불규칙한 모습을 보였고 활막 조직과 연골의 변성 및 변형이 현저하게 나타났다. Indo 군과 CBT군은 대조군과 비교하여 활막 조직 및 연골이 정상 상태에 가까워 조직 손상이 억제되는 것을 확인하

였다(Fig. 20).

2) Safranin-O staining

관절 조직의 proteoglycan 소실 정도를 관찰하기 위해

Fig. 21. Histological observation on joint (Safranin-O staining, $\times 100$). Normal: normal rats, Control: MIA-induced osteoarthritis and distilled water treated rats, Indo: MIA-induced osteoarthritis and indomethacin 5 mg/kg treated rats, CBTL: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 100 mg/kg treated rats, CBTH: MIA-induced osteoarthritis and *Chulbu-tang* 200 mg/kg treated rats, MIA: monosodium iodoacetate.

Safranin-O stain을 실시한 결과, 대조군에서는 골관절염이 유발되어 관절조직이 변형되고 proteoglycan의 대부분이 파괴되어 연골의 형태학적 변화를 야기했다. 반면, Indo와 CBT에서는 대조군에 비해 관절 조직의 변형과 proteoglycan의 소실이 억제되는 것으로 관찰되었다. 또한 CBTL보다는 CBTH에서 proteoglycan의 파괴를 더욱 억제함을 보여주었다(Fig. 21).

고찰»»»»

퇴행성 관절질환, 퇴행성 관절염으로 불리는 골관절염(OA)은 관절의 염증성 질환 중 가장 흔한 만성 관절 질환으로 관절 연골의 국소적이고 점진적인 소실 및 그와 연관된 뼈와 관절막, 주위 인대 등에 2차적인 손상 및 증상을 동반하여 반복적이고 지속적인 통증, 변형, 운동 장애나 관절의 강직감을 유발한다¹⁾.

건강보험심사평가원의 '2017년 건강보험 통계연보'에 따르면 한국 65세 이상 성인의 다빈도 질환 중 골관절염은 백내장, 치매, 폐렴, 뇌경색에 이어 5위를 차지했다¹⁹⁾.

퇴행성 관절염의 치료를 위해서는 생활습관 개선과 같은 행동요법, 약물치료 요법, 관절국소치료 요법과 같

은 보존적 치료법과 수술 치료법이 있다. 이중 약물치료 요법은 스테로이드 제제(부신 피질 호르몬제)를 관절 내에 주입하거나 진통 및 소염을 목적으로 비스테로이드성 소염제가 주로 처방되고 있으나, 이는 장기 사용 시 관절 연골의 변성 촉진, 소화기 장애나 혈액 응고 장애 등의 부작용을 일으키기에 사용 시 주의가 요구된다⁷⁻⁹⁾.

퇴행성 관절염은 관절 연골의 퇴행성 변화에 따른 것이기에 이를 치료하기 위한 확실한 방법은 없으며, 골관절염의 치료 목적은 통증을 완화시키고 관절의 변형을 방지하면서 기능을 유지시키는 데 있다고 할 수 있다^{10,12)}. 그러나 최근에는 골관절염 발생의 원인에 대한 깊이 있는 연구가 진행됨에 따라 병의 진행을 지연시키고 연골 손상을 회복시키는데 초점을 둔 새로운 시도가 보고되고 있다²⁰⁾.

본 연구에 사용된 尢附湯은 白朮, 炮附子, 炒杜仲, 生薑으로 구성되어 있다. 白朮은 健脾益氣하고 燥濕利水하는 효능이 있으며²¹⁾, 白朮의 EtOH 추출물은 collagen 유도 관절염 rat의 혈청 내 anti-collagen 항체와 TNF- α 의 증가를 유의성 있게 억제시켜 콜라겐으로 유도한 관절염 rat에서 관절염 증상을 억제하는 것으로 보고되었다¹³⁾. 附子是 回陽補火, 散寒除濕의 효능이 있으며²¹⁾, 附子 藥鍼으로 IgG, IgM, TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등 염증

관련 사이토카인의 활성을 억제하여 관절염에 억제 효과가 있는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 본 연구에서는 附子의 독성이나 자극성을 감소시키기 위하여 炮附子를 사용하였다²¹⁾. 杜仲은 補肝腎, 强筋骨하는 효능이 있으며²¹⁾, 杜仲 추출물은 항산화 효과가 보고되었다¹⁵⁾. 본 연구에서는 杜仲의 약효 증대를 위하여 炒한 杜仲을 사용하였다²¹⁾. 生薑은 溫中逐寒, 回陽通脈하는 효능이 있으며²¹⁾, rat의 면역세포에 대한 항염증 실험 결과 유의한 효과가 있다고 보고되었다¹⁴⁾.

이와 같이 朮附湯을 구성하는 각각의 약재들은 항산화, 항염증 및 면역반응 조절 등의 탁월한 효과를 가지고 있음이 다양한 연구에서 보고되고 있기에 각 약재의 복합제인 朮附湯도 산화적 손상, 항염증 효과가 있는지 알아보았고 관절염 유발 실험쥐에 대한 효과도 검증하였다.

먼저, 朮附湯의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 항산화 관련 물질은 유리기와 반응을 하며 활성화된 라디칼에 전자를 공여하여 라디칼을 소거하는 항산화 효능을 보이게 된다. 朮附湯의 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 朮附湯의 DPPH 소거능을 IC₅₀값으로 나타내었을 때 285.41±1.11 µg/mL이었고, ABTS 소거능을 IC₅₀값으로 나타내었을 때 339.62±0.70 µg/mL이었다. 이로써 朮附湯이 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 우수함을 확인하였으며, 이런 항산화 능력이 골관절염으로 인한 조직 손상을 억제할 것으로 생각된다.

본 동물실험에서는 朮附湯이 체중변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 체중변화와 식이효율을 측정하였다. 모든 실험군의 체중이 증가하였고(Table II, Fig. 3) 식이효율에서도 유의성 있는 차이는 없었다(Table III, Fig. 4). 이를 통해 朮附湯이 식이에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 또한 골관절염이 유발된 rat의 통증 변화를 관찰하기 위하여 뒷다리 체중 부하를 측정하였다. 뒷다리 체중 부하 검사는 통증의 정도를 더 객관적으로 판단할 수 있는 지표로 사용된다²²⁾. 약물 투여 2주후 CBT와 Indo에서 유의하지는 않았으나 뒷다리 체중 부하가 감소하는 경향을 보였다(Table IV, Fig. 5). 이러한 결과로 보아 朮附湯은 골관절염이 유발된 쥐에서 통증을 감소시킬 것으로 생각된다.

생체의 대사 과정 중에 발생하는 reactive oxygen species (ROS)에는 superoxide radical (O₂⁻), hypochlorous

acid (HClO), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (HO[·]), peroxy radical (ROO[·]) 등이 있으며, 일반적으로 반응성이 높고 불안정하여 생체의 생리적, 생화학적 손상을 유발하는 물질이다²³⁾. 생체는 이런 ROS를 효율적으로 제거하기 위하여 항산화 시스템을 가지고 있으며 산화(oxidant)와 항산화(anti-oxidant)의 균형을 통해 생체의 항상성을 유지시키고 있다. 하지만 산화-항산화의 불균형이 발생하게 되면 ROS가 축적하고 이는 세포의 유전자 발현의 변화, 신호 전달 경로의 변화, 생체 분자의 손상 등 산화적 스트레스 상태에 놓이게 된다²⁴⁾. 이러한 활성산소종은 연골조직을 파괴하는 물질 중 하나로 연구되고 있다. H₂O₂는 조직에 손상을 직접 가하지는 않지만 여러 경로를 통해 반응성 높은 HO[·]로 전환되어 조직에 손상을 끼치는 것으로 보고되고 있다. 세포막 단백질인 NADPH oxidase는 NOX4, p47^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, Rac1 등으로 구성되어 있고, O₂을 발생시키는 효소 단백질이다. 평상시에 cytosol에 자리하고 있다가 세포가 자극을 받으면 p47^{phox} 단백질이 인산화되어 p22^{phox}의 SH3 domain에 결합하게 되고 이를 통해 활성화가 되면 O₂를 생성시킨다. NOX4는 p22^{phox}의 조절 기전에 의해 H₂O₂를 과잉 생성하는데 이 과정에서 미토콘드리아의 전자전달계를 통하여 과잉 생산된 O₂에 전자를 운반하여 H₂O₂로 전환시켜 염증반응에 관여한다고 알려져 있다²⁵⁾. 본 실험에서 western blot을 통한 관절 조직의 NOX4의 발현은 CBTL과 CBTH에서 유의하게 감소하였으며(Fig. 6), p22^{phox}의 발현은 CBTH에서만 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 7). 이러한 점으로 미루어 보아 朮附湯은 관절 조직 내 산화적 스트레스 관련 인자인 NOX4와 p22^{phox}를 억제하여 세포막의 산화 작용을 억제함으로써 골관절염에 효과가 있을 것으로 생각된다.

평상시 Nrf2는 세포질 내에 존재하다가 항산화 약물이나 산화적 스트레스와 같은 해로운 자극이 주어지면 다양한 유전자의 전사를 통하여 세포 내의 항상성을 유지시키는 역할을 한다. Nrf2에 의해 유도되는 HO는 heme의 분해에 중요한 효소로 HO-1, HO-2, HO-3와 같은 3종류의 isoform이 존재한다. 이 중 HO-1은 정상 상태에서는 발현되지 않으나 세포 외에서 주어지는 자극(heme, lipopolysaccharide, cytokine, 성장인자, 항산화물질)이나 산화적 스트레스 등의 자극을 통해서 발현이 증

가하는 유도성 효소 단백질이다²⁶⁾. HO-1의 증가는 염증성 cytokine의 생산을 막거나 세포사멸을 억제하고, 항산화제로서 작용을 하며 골관절염과 같은 염증성 질환을 조절한다고 알려져 있다^{27,28)}. O₂⁻는 호중구(neutrophil)의 활성산소종 대사과정 중 첫 번째로 작용하는 라디칼로 SOD에 의해 H₂O₂로 전환된다. 여기서 생성된 H₂O₂는 catalase와 GPx의 작용에 의하여 무해한 H₂O로 분해되는데 이러한 일련의 과정을 거쳐 인체는 해로운 활성산소를 제거하여 세포 손상을 방지하게 된다²⁹⁾. 본 실험에서 항산화 단백질의 발현을 평가하였을 시 모든 항산화 관련 단백질이 증가하였다. CBTH는 Nrf2의 활성을 통해 SOD와 GPx를 유의하게 증가시켰다. 하지만 HO-1과 catalase는 증가하였으나 유의하지는 않았다(Figs. 8-12). 이는 ⌘附湯이 항산화 관련 단백질의 활성을 증가시켜 염증반응에 따른 산화적 손상을 저해하는 작용을 한다고 판단된다.

NF-κB는 면역기능, 세포사멸, 염증 등을 조절하는 전사인자의 하나로 일반적인 상태에서는 세포질 내에서 IκB-α와 결합한 채로 불활성 상태이지만, 외부 자극에 의하여 IκB-α가 인산화되면 NF-κB가 세포핵 내부로 이동하여 전사인자로서 작용하게 된다³⁰⁻³²⁾. 이때 NF-κB가 활성화되어 핵 내로 전사가 이루어지면 COX-2와 iNOS와 같은 염증성 매개 인자와 TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 염증성 cytokine을 유도하게 된다. 본 실험에서 Indo와 CBTH에서 p-IκBα와 NF-κB의 발현은 대조군에 비하여 유의하게 억제되었으나 CBTL은 NF-κB의 활성화만 유의하게 억제하였다(Figs. 13, 14).

COX-2는 염증반응에 관여하는 효소 단백질로 주로 prostaglandin E₂를 형성시키며 염증과 관계되는 단핵구 세포, 대식세포, 활액막 세포에서 높게 발현되고³³⁾, iNOS는 면역 반응이 활성화 되었을 때 유도되며 nitric oxide (NO)를 생성하여 유익한 작용을 하지만 골관절염과 같은 염증 질환에서 NO의 과량 생성은 연골 세포에서 염증성 cytokine의 분비 촉진 및 proteoglycan과 collagen의 합성을 억제시키며 기질분해 효소로서 작용하여 연골 세포의 사멸과 염증반응을 조장한다³⁴⁾.

관절 조직 내 염증성 매개인자를 관찰한 결과, iNOS는 모든 약물 투여군에서 유의하게 감소하였으나 COX-2는 Indo와 CBTH에서만 유의하게 감소하였다(Figs. 15, 16).

TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 염증성 cytokine은 관절

조직이나 연골을 손상시키거나 파괴하기 때문에 골관절염을 치료할 때 핵심 요소로 염증성 cytokine의 억제를 들 수 있다. 이들은 대식세포 등을 포함한 염증 세포들에서 발현되고 TNF-α는 주로 대식세포에서 생성되며 면역 반응의 초기에 분비되어 염증의 활성화를 유도하는 cytokine으로 TNF-α의 과생산은 IL-6와 IL-1β와 같은 하위 cytokine의 생성을 자극하며 활액 내 염증, 연골 파괴와 골의 손실을 촉진시켜 골관절염의 진행을 유도한다²⁸⁾. 본 실험에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현은 모든 약물 투여군에서 감소하였으며, 특히 CBTH에서는 세 cytokine 모두가 유의하게 감소하였다(Figs. 17-19). 이러한 점으로 미루어 보아 ⌘附湯은 관절 조직에서 염증성 매개인자들의 생성을 억제할 뿐만 아니라 동시에 염증성 cytokine 분비를 억제하여 항염증 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

골관절염을 유발한 관절의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 H&E와 Safranin-O 염색을 실시하였다. H&E 염색 결과에서 정상군은 활막이나 연골 조직이 정상적으로 보이고, 골관절염을 유발한 대조군은 조직의 변형 및 변형이 두드러지게 나타났다. CBT와 Indo에서는 대조군과 비교하였을 시 조직 손상이 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 20). Safranin-O 염색 결과, 대조군에서는 골관절염이 유발되어 관절 조직이 변형되고, proteoglycan이 심각하게 파괴된 것을 관찰할 수 있었고, CBT군과 Indo군에서는 골관절염 대조군에 비해 변형이 억제되고 proteoglycan의 소실도 감소한 것으로 나타났다(Fig. 21). 조직학적 분석 결과를 종합하면 대조군에서는 연골조직과 활막조직의 손상, proteoglycan층의 파괴가 관찰되었으나, CBT군에서는 손상 부위의 회복 및 proteoglycan의 파괴가 억제되는 것을 보여주었다. 따라서 ⌘附湯의 투여가 관절 및 연골 조직의 손상을 억제하여 관절의 회복을 돕는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과들을 종합해서 판단할 때, ⌘附湯은 MIA로 유발된 rat의 골관절염에서 세포막의 산화적 스트레스를 억제하고 Nrf2 경로를 활성화시켜 항산화 단백질을 증가시키고 동시에 NF-κB 경로를 억제하여 염증성 단백질의 발현을 억제함으로써 결과적으로 관절 조직의 손상을 감소시켰다. 이를 통해 ⌘附湯이 항산화와 항염증 효과가 있으며 골관절염 유발 동물 모델 실험에서 염증 억제 및 연골 보호 효과를 확인하였다.

결론>>>>

본 연구에서는 尢附湯의 항산화, 항염증 및 골관절염 유발 동물 모델에 미치는 영향을 알아보기 위해 체중의 변화, 뒷다리 체중 부하, 산화적 스트레스 관련인자, 항산화 단백질, 염증성 단백질 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CBT에서 대조군에 비해 뒷다리 체중 부하가 감소하는 경향을 보여주었다.
2. CBTH에서는 관절 조직에서 산화적 스트레스와 관련된 단백질인 NOX4와 p22^{phox}의 발현량이 유의하게 감소되었다.
3. CBTH에서는 Nrf2 경로를 활성화하여 SOD, GPx-1/2와 같은 항산화관련 효소 단백질이 유의하게 증가하였다.
4. CBTH는 NF-κBp65 경로를 억제하여 염증성 매개인자(COX-2, iNOS) 및 염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6)의 발현이 유의하게 감소하였다.
5. CBT는 조직병리학적 검사에서 활막조직, 연골 및 proteoglycan의 손상을 효과적으로 억제하였다.

이상의 결과를 종합적으로 판단해 볼 때 尢附湯은 항산화 및 항염증 효과가 있으며 MIA로 유발된 쥐의 골관절염 진행을 효과적으로 억제시키고, 관절 조직과 연골의 손상을 보호하는데 효과적이었다고 생각한다. 이와 같은 결과를 바탕으로 추가적인 연구가 이루어져서 골관절염 연구에 진전이 있기를 기대한다.

References>>>>

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:84-98.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013:49-50, 99-100, 317-26.
3. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced Cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):1-12.
4. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(3):647-57.
5. Park SH, Park CY, Kim SK, Kim CG, Choe JY, Shin IH. Safety and efficacy of piroxicam patches for treating knee osteoarthritis. *Korean Journal of Medicine*. 2008;74(5):537-45.
6. Song YJ, Ha CW. The use of COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of osteoarthritis. *Knee Surgery & Related Research*. 2009;21(2):93-101.
7. Choung RS. Use of aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs increases risk for diverticulitis and diverticular bleeding. *Intestinal Research*. 2011;9(3):247-9.
8. Cho KM, Ryu JS. Risk factors for obscure gastrointestinal bleeding in NSAID users [dissertation]. Gwangju:Chonnam National University; 2015.
9. Kim HJ, Jeong WC, Lee KM, Baek CR, Jeong SH, Kim JD, Jeong SH, Kwak JW. Multiple gastrointestinal drug induced ulcers associated with aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs: a case report and review of the literature. *Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy*. 2009;39(6):379-83.
10. Yoh SB, Sul JU, Shin MS. Research trends on the treatment of knee osteoarthritis in Korean medicine. *Korean J Acupunct*. 2011;28(1):139-55.
11. Gu JH, Kim ES, Park YC, Jung IC, Lee EJ. A systematic review of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis. *J Korean Med Rehabil*. 2017;27(3):47-60.
12. Heo J. Dongeuiibogam. Seoul:Yeogang Publishing. 1994:913.
13. Kim SH, Park YK. Effects of Atractylodis Rhizoma Alba extract on collagen-induced arthritis in mice. *The Korea Association of Herbology*. 2012;27(3):1-6.
14. Kim YH, Yim YK, Lee H. The effects of herbal-acupuncture with Aconiti lateral Radix Preparata Radix solution on collagen-induced arthritis. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2006;23(2):137-54.
15. Kim SH, Kim IC. Antioxidative properties and whitening effects of the Eucommiae cortex, Salviae miltiorrhizae radix, Aurantii nobilis pericarpium and Cnidii rhizoma. *The East Asian Society of Dietary Life*. 2008;18(4):618-23.
16. Ryu HS, Kim HS. Effect of Zingiber officinale roscoe extracts on mice immune cell activation. *J Nutr Health*. 2004;37(1):23-30.
17. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Agata I, Noro T, Okuda T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects if tannins and related polyphenols

- on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989;37(8):2016-21.
18. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
19. Kim SH, Kim YI. Health Insurance Statistical Yearbook in 2017 Health Insurance Statistical Yearbook. Health Insurance Review & Assessment Service. 2018 [cited 2019 Dec 9] Available from: URL: <https://www.hira.or.kr/bbsDummy.do?pgmid=HIRAA020045020000&brdScnBltNo=4&brdBltNo=2310#none>.
20. Hasegawa A, Otsuki S, Pauli C, Miyaki S, Patil S, Steklov N, Kinoshita M, Koziol J, D'Lima DD, Lotz MK. Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):696-704.
21. Korean Herbalogy Society. Herbalogy. 3rd ed. Seoul: Young-lim. 2016:131-603.
22. Lee YM, Son E, Kim SH, Kim DS. Effect of *Alpinia oxyphylla* extract in vitro and in a monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Phytomedicine.* 2019;65:153095.
23. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652-9.
24. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44(1):239-67.
25. Altenhfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans JJ, Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt HH. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(14):2327-43.
26. Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(10):1767-812.
27. Shyy JY, Fitting C, Tsagris L, Boczkowski J, Savouret JF, Corvol MT, Poiradeau S, Rannou F. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2585-94.
28. Kobayashi H, Takeno M, Saito T, Takeda Y, Kirino Y, Noyori K, Hayashi T, Ueda A, Ishigatsubo Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1132-42.
29. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrea F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36(1):1-9.
30. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997;20(6):252-8.
31. Park SH, Lee HJ, Ryu JH, Lee SY, Shin HD, Hong JH, Seok JH, Lee CJ. Effects of silibinin and resveratrol on degradation of I κ B and translocation of NF- κ B p65 induced by tumor necrosis factor- α in cultured airway epithelial cells. *Yakhak Hoeji.* 2014;58(1):1-6.
32. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* 2001;107(1):13-9.
33. Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, Fikrig E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine lyme arthritis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(3):187-91.
34. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006;17(2):55-7.