

족삼리의 仙茅약침이 Monosodium Iodoacetate로 유발한 골관절염 흰쥐에 미치는 영향

지민정, 임성철, 김재수, 이현종, 이윤규*

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실



[Abstract]

Effects of *Curculiginis Rhizoma* Pharmaco-Acupuncture at ST₃₆ on Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Min Jung Ji, Seong Chul Lim, Jae Soo Kim, Hyun Jong Lee and Yun Kyu Lee*

Department of Acupuncture & Moxibustion, Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University

Objectives : This study was designed to investigate effects of *Curculiginis Rhizoma* pharmaco-acupuncture at ST₃₆ on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats.

Methods : Twenty rats were divided into four groups consisting of 5 rats: rats receiving no injection(normal), rats injected with monosodium Iodoacetate(MIA, control), rats injected with MIA and normal saline(N-S), and rats injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma* (CRPA). N-S and CRPA were administered once a day at ST₃₆ during 21 days. After that we examined the weight-bearing ability of hind paws, liver and kidney function, immunocell, cytokines, proteins, and gene expression of cytokines. Injury of synovial tissue was measured by H & E, Safranin O immunofluorescence.

Results : The weight-bearing ability of the hind paws, Serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2, LTB4, DPD, Osteocalcin, Protein COX-2 of CRPA decreased significantly. Protein Arachidonate 5 li-poxygenase of CRPA was decreased, but not significantly. Expression of gene COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS2 of CRPA decreased. In histological observations, CRPA was improved, compared with other control groups.

Conclusions : It can be suggested that *Curculiginis Rhizoma* pharmaco-acupuncture at ST₃₆ has anti-inflammatory and pain relief effects on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rats.

Key words :

Curculiginis Rhizoma
 pharmaco-acupuncture;
 Osteoarthritis;
 Monosodium
 iodoacetate(MIA);
 ST₃₆

Received : 2015. 02. 09.

Revised : 2015. 02. 22.

Accepted : 2015. 02. 23.

On-line : 2015. 03. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Pohang Oriental Hospital of Daegu Haany University, 411, Saecheonbyeon-daero, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, 790-826, Republic of Korea
 Tel : +82-54-271-8010 E-mail : hanyeesarang@hanmail.net

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)

Copyright © 2014 KAMMS. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

I. 서 론

골관절염은 성인에서 가장 흔한 관절 질환의 하나로 퇴행성 관절염 또는 퇴행성 관절질환이라고 하며, 국소적인 관절에 대하여 점진적인 관절연골의 소실과 그와 관련된 이차적인 변화와 증상을 동반하는 질환을 의미한다.

골관절염은 주로 체중이 부하되는 관절에 많이 침범하며 관절연골의 국소적인 퇴행성 변화 및 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등을 그 특징으로 한다. 염증변화는 소수에서 나타나고 임상적으로는 반복적인 통증 및 관절 강직감, 점진적인 운동장애 등을 초래한다^{1,2)}.

한의학에서 관절염은 痺症, 歷節風, 鶴膝風 등의 범주에 속하며, 그 원인은 風·寒·濕·熱의 邪氣가 인체의 正氣가 허약한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣運行이 저해되어 발생하는 것으로 본다¹⁾.

골관절염에 대한 치료로 한의학에서 鍼刺法, 灸法, 瀉血療法, 附節療法, 耳鍼療法, 電鍼療法 등이 있으며 자침과 약물의 효과를 동시에 누릴 수 있는 藥鍼療法 또한 임상에서 다양하고 있다^{3,4)}.

관절염과 관련한 藥鍼療法으로 Kim et al⁵⁾은 蜂毒약침과 鹿茸약침이 관절염에 미치는 영향을, Lee et al⁶⁾은 薑黃약침이 관절염에 미치는 영향을, Koo et al⁷⁾은 柴胡약침이 관절염에 미치는 영향을, Bae et al⁸⁾은 馬錢子약침이 관절염에 미치는 영향에 관한 연구를 보고하였으며, 이 외에도 관절염에 다양하게 연구되고 있다.

仙茅(*Curculiginis Rhizoma*)는 補陽藥으로 補腎陽, 強筋骨, 祛寒濕하여 筋骨痿軟, 腰膝冷痺, 陽虛冷瀉, 陽萎精冷, 遺精早泄 등의 증상에 응용된다⁹⁾. 仙茅에 관하여 항염증¹⁰⁾ 및 항혈전¹¹⁾, 골다공증 치료¹²⁾ 등의 효능에 대한 다양한 연구가 보고되고 있으나, 골관절염과 관련한 약침연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

이에 저자들은 모노소듐 아이도아세테이트(monosodium iodoacetate, 이하 MIA)로 유발한 골관절염 흰쥐의 족삼리(ST₃₆)에 仙茅약침을 시술하여 뒷다리 체중부하 검사 및 혈액 및 혈청학적 변화, 유전자 발현 변화, 조직학적 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험용 동물

수컷 6주령의 실험용 흰쥐(Rat, 175~200 g)는 Charles River사(Wilmington, USA)에서 공급 받았다. 동물은 실험 당일까지 고형 사료(항생제 무첨가, 삼양사료사, 한국)와 물을 충분히 공급하였고, 온도 22 ± 2 °C, 습도 55 ± 15 %, 12시간 명암주기의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재 및 약침의 제조

약침에 사용할 약재인 仙茅는 옴니허브사(영천, 한국)에서 구입하여 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실에서 관능검사상 약전기준에 부합한 것만을 정선하여 사용하였다. 약침은 다음의 과정으로 조제되었다. 仙茅 200 g을 분쇄기로 분쇄시킨 후 100 % EtOH를 약재 무게의 10배(2 L)를 붓고 24시간 동안 상온에 정치시켰다. No. 2. paper filter로 1차 여과한 후 감압 농축하여 동결건조하였다. 동결 건조된 仙茅는 -80 °C의 냉동고에 보관하였으며, 仙茅약침액은 사용하기 직전에 희석하여 0.22 μm filter를 이용하여 여과 후 사용하였다. 仙茅의 수율은 1.2였다.

2. 연구 방법

1) 군 설정

실험은 정상군(normal)과 대조군(control), 생리식염수 대조군(N-S), 실험군(curculiginis rhizoma pharmacopuncture, CRPA)으로 분류하여 총 4개의 군으로 나누어 진행하였다. 각 군은 5마리의 흰쥐로 구성되었다.

2) 골관절염 유발

마취제인 chloral hydrate를 이용하여 흰쥐를 복강 내 주사로 마취시켰다. 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA(Sigma. Chemical Co. Ltd, Cat. No. I2512)를 인슐린주사기로 우측 무릎 관절강 내에 50 μl(60 mg/ml)씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9 % saline을 사용하였다. MIA 주사 7일 후에 관절염 유발 유무를 확인하여 관절염이 유발된 동물만을 사용하였다. 최종적으로 각 군마다

총 5마리의 흰쥐로 구성되었다.

3) 각 군별 처치

정상군은 아무런 처치를 하지 않았다. 대조군은 MIA로 관절염을 유발시킨 후 아무런 처치를 하지 않았다. N-S와 CRPA는 MIA로 관절염을 유발시킨 후 N-S는 생리식염수를, CRPA는 仙茅약침액을 1일 1회씩 총 21일 동안 100 μ l씩 insulin syringe(insulin syringe 0.3 ml, 31 Gage, BD, New Jersey, USA)로 시술하였다. 시술부위는 患側 족삼리에 피부로부터 2 mm 깊이에 取穴하였고, 시술은 오전 10시에 하는 것을 원칙으로 하였다.

4) 체중변화

6주령의 실험용 흰쥐를 1주간 기본사료(AIN-76A diet, Teklad, USA)로 적응시킨 후 MIA로 관절염을 유발하였다. 체중변화는 0, 7, 14, 21일째 오전 9시에 측정하여 기록하였다.

5) 뒷다리 체중부하 검사

오후에 측정하는 것을 원칙으로 하였다. 시험물질을 穴位에 투여한 후 0, 7, 14, 21일째 되는 날에 각각 측정을 하였다. Incapacitance tester(Linton Instrument Co, UK, Ser No. 01/45/25)로 우측, 좌측의 뒷다리 체중부하 정도를 각각 측정하였다. MIA에 의해 골관절염이 유발된 흰쥐는 MIA를 투여하지 않은 발에 의지하여 tester의 holder 안에 서게 되며, 흰쥐의 배가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 우측, 좌측 다리의 체중부하 정도를 각각 측정하였다. 실험 결과는 우측 다리의 체중부하에 대한 좌측 다리의 체중부하의 비율(weight on left leg / weight on right leg)을 계산하여 Mean(%) \pm SD로 표시하였다.

6) 혈액 분석

실험종료 후 모든 동물은 12시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 관에 담고, 혈청분리용 관의 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 이용하였다. 분리한 혈청에서 간기능의 지표인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 및 신장기능의 지표인 creatinine 함량을 생화학자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)로 측정하였다. 또한 혈액 내 면역세포를 관찰하기 위해 항응고제인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)가 들어 있는 채혈관을 이용하여 자동혈구 분석기(HEMAVET, CDC Technology, USA)로 분석하였다.

7) 혈청 내 염증 cytokine 및 염증 매개인자 생성 측정

IL-1 β , IL-6, TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 두었으며, 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준 품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준 품과 상청액을 100 μ l씩 넣었으며, 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

또한, 혈청에서 PGE2, LTB4, Osteocalcin 그리고 deoxyypyridinoline(DPD)의 생성량을 측정하였다. 각 well에 흰쥐의 혈청 100 μ l(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 동안 실온에 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에 방치한 후 2회에 걸쳐 washing 완충 용액으로 세척한 후, antibody avidinhorseradish peroxidase conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 동안 실온에 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 기질을 100 μ l씩 분주하고 어두운 곳에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리하였고, ELISA leader(Molecular Devices, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 동물조직의 염증성 단백질 및 유전자 발현 분석

약침 시술이 완료된 후에는 실험동물의 사체로부터 활막 조직을 채취하여 효소를 처리하여 lysate를 만들거나, 조직으로부터 ribonucleic acid(RNA)를 분리하여 ELISA나 quantitative real time polymerase chain reaction(PCR) 등의 방법을 통해 COX-2, Arachidonate 5 lipoxigenase(5-LOX)의 단백질과 mRNA 발현 정도를 분석하였다. 단백질 분석에 있어 흰쥐의 관절 조직을 분리하여 homogenizer(OMNI, USA)를 이용하여 조직을 분쇄한 후 bradford assay kit로 단백질 정량을 하였다. 모든 관절 조직을 1 mg/ml로 희석하고, COX-2와 5-LOX 96 well plate에 100 μ l씩 각각 관절조직 현탁액을 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 24

시간 동안 두었으며, 24시간 후 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준 품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준 품과 관절조직 현탁액을 100 μ l씩 넣었으며, 2시간 동안 well을 막은 후 실온에 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온에 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

활막조직의 유전자 발현 양상은 real-time PCR 증폭법을 사용하여 알아보았다. 활막조직은 RNAsol®(Tel-Test) 용액을 사용하여 각 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤 one-step SYBR green PCR kit를 사용하여 cDNA 및 real-time PCR 분석을 하였다. 활막조직에 RNazol® 500 μ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 여기에 chloroform(CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에 15분간 방치했다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase inhibitor(10 U/ μ l) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30분간 반응한 후 75 °C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 °C heating block에서 45분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후, 95 °C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

유전자 발현은 TaqMan probe(FAM dye-labeled, ABI, USA)를 사용하였고, internal standard는 mouse GAPDH probe set endogenous control(VIC®) / MGB Probe,

Probe limited) from applied biosystems(4352339E)를 사용하였으며, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 2 mins at 50 °C, 10 mins at 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 45 °C에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR $y = x(1 + e)^n$, $x =$ starting quantity, $y =$ yield, $n =$ number of cycle, $e =$ efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)을 측정하였다.

9) 병리 조직학적 검사

실험종료 후 슬관절 부위를 절단하여 10 % EDTA가 포함된 10 % formalin 용액에 넣어 관절을 탈회시켰다. 방사선 촬영으로 탈회 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절을 넣고 고정된 다음 관상단면을 만들었다. 각각의 슬관절로부터 60 μ m 두께로 5개의 단면을 얻은 후, 현미경 사진촬영을 통해 medial femoral, lateral femoral, medial tibial, lateral tibial condyles에서 보이는 병리조직학적 변화를 관찰하였다. 또 탈회 파라핀으로 고정된 조직을 7 μ m의 크기로 자른 후, H & E 및 safranin O 염색을 실시하여 조직의 상태를 bight phase contrast microscopy(Nikon, Japan)로 관찰하였다. 염증반응 발생 유무나 활막세포의 증식, 염증세포의 조직침윤 여부는 H & E 염색결과에서 확인할 수 있었으며, proteoglycan층을 염색하는 safranin O 염색결과에서는 연골조직의 손상여부를 확인할 수 있었다.

10) 통계처리

실험결과는 SPSS 11.0의 이중 쌍체 비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하여 student *t*-test로 검증한 후 유의성을 보았으며, 유의성은 $p < 0.05$ 인 경우에만 판정하였다³⁾.

III. 결 과

1. 체중분석

대조군은 정상군에 비해서 실험기간 동안 체중이 감소하였으나 유의성 있는 차이는 없었다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 실험 7일부터 14일까지는 체중이 감소하였고, 실험 21일에는 체중이 증가하였으나 유의성 있는 차이는 없었다 (Table 1).

Table 1. Effects of CRPA on Body Weight of MIA-induced Osteoarthritis Rats

Group	Body weights(g)			
	0	7	14	21 days
Normal	297.8±4.31	333.7±6.94	363.5±6.72	371.5±4.12
	290.8±2.59	317.8±4.91	345.8±6.27	360.0±3.46
Control	300.0±4.22	313.7±4.82	336.0±4.95	363.6±6.27
	309.6±5.80	312.8±7.99	341.2±9.97	365.8±10.34

The results were expressed as mean ± SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone.
 Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
 CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.

2. 뒷다리 체중부하 측정

뒷다리 체중부하 비율을 측정한 결과, 정상군은 실험기간 동안 일정하게 유지되었다. 실험 7일까지 뒷다리 체중부하 비율은 대조군과 N-S, CRPA에서 증가하였지만, 실험 7일부터 21일까지는 감소하는 경향을 보였다. 실험 7일부터 N-S와 CRPA에서 대조군에 비해 뒷다리 체중부하 비율이 낮았으며, 14일부터 21일까지 CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다(* : $p < 0.05$)(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of CRPA on Changes of Weight Bearing in Hind Paws of MIA-induced Osteoarthritis Rats

Group	ratio			
	0	7	14	21 days
Normal	1.16±0.11	1.04±0.05	1.05±0.03	1.04±0.11
	0.61±0.10	4.06±1.23	2.48±0.20	2.60±0.47
Control	0.86±0.14	2.37±0.36	1.78±0.25	1.80±0.12
	0.67±0.13	1.73±0.36	1.57±0.25*	1.12±0.15*

The results were expressed as mean ± SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone.
 Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
 CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.
 * : statistically significant compared with control group ($p < 0.05$).

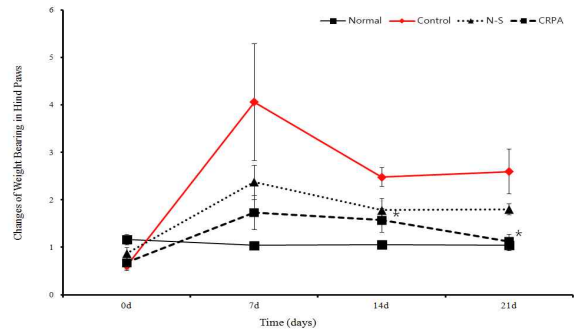


Fig. 1. Effects of CRPA on changes of weight bearing in hind paws of MIA-induced osteoarthritis rats

The results were expressed as mean ± SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone.
 Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
 CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.
 * : statistically significant compared with control group ($p < 0.05$).

3. 혈액분석

1) 간 기능에 미치는 영향

AST는 정상군에서 114.2 ± 7.2 U/L, 대조군에서 188.7 ± 9.2 U/L, N-S에서 123.2 ± 4.7 U/L, CRPA에서 140.8 ± 7.5 U/L로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(*** : $p < 0.001$)(Fig. 2). CRPA도 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(** : $p < 0.01$)(Fig. 2).

ALT는 정상군에서 30.5 ± 2.8 U/L, 대조군에서 42.8 ± 1.7 U/L, N-S에서 44.5 ± 4.6 U/L, CRPA에서 45.4 ± 1.7 U/L로 나타났다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 유의성이 없었다(Fig. 2).

2) 신장 기능에 미치는 영향

정상군에서 0.14 ± 0.018 mg/dl, 대조군에서 0.37 ± 0.012 mg/dl, N-S에서 0.22 ± 0.019 mg/dl, CRPA에서 0.24 ± 0.011 mg/dl로 나타났다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(*** : $p < 0.001$)(Fig. 2).

3) 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

(1) 총 백혈구 생성량

백혈구 수는 정상군에서 $8.18 \pm 0.85 \times 10^3/\mu\text{l}$, 대조군에서 $11.14 \pm 2.65 \times 10^3/\mu\text{l}$, N-S에서 $6.12 \pm 0.54 \times 10^3/\mu\text{l}$, CRPA에서 $4.78 \pm 0.43 \times 10^3/\mu\text{l}$ 로 나타났다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

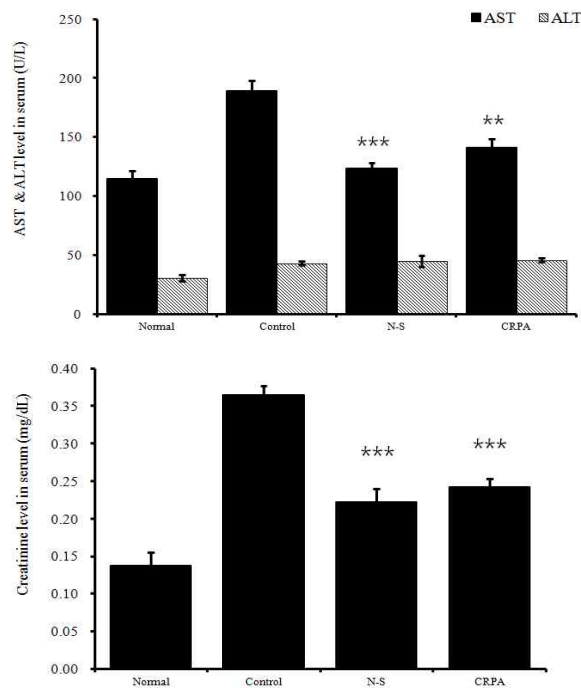


Fig. 2. Effects of CRPA on AST, ALT and Creatinine of MIA-induced osteoarthritis rats

The results were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone.
 Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
 CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.
 ** : statistically significant compared with control group ($p < 0.01$).
 *** : statistically significant compared with control group ($p < 0.001$).

(2) 호중구, 단핵구의 비율

호중구의 비는 정상군에서 1.98 ± 0.14 %, 대조군에서 4.70 ± 0.28 %, N-S에서 3.44 ± 0.68 %, CRPA에서 3.08 ± 0.10 %로 나타났다. 단핵구의 비는 정상군에서 16.53 ± 0.95 %, 대조군에서 20.94 ± 2.01 %, N-S에서 12.48 ± 2.13 %, CRPA에서 10.40 ± 0.78 %로 나타났다. N-S에서 대조군에 비해 호중구와 단핵구는 감소하였으며, 단핵구는 유의성 있게 감소하였다(* : $p < 0.05$)(Fig. 3). CRPA는 대조군에 비해 호중구와 단핵구 모두 유의성 있게 감소하였다(** : $p < 0.01$)(Fig. 3).

4. 혈청 내 염증 cytokine 및 염증 매개 인자 생성에 미치는 영향

1) TNF- α

TNF- α 생성량은 정상군에서 17.2 ± 0.8 pg/ml, 대조군

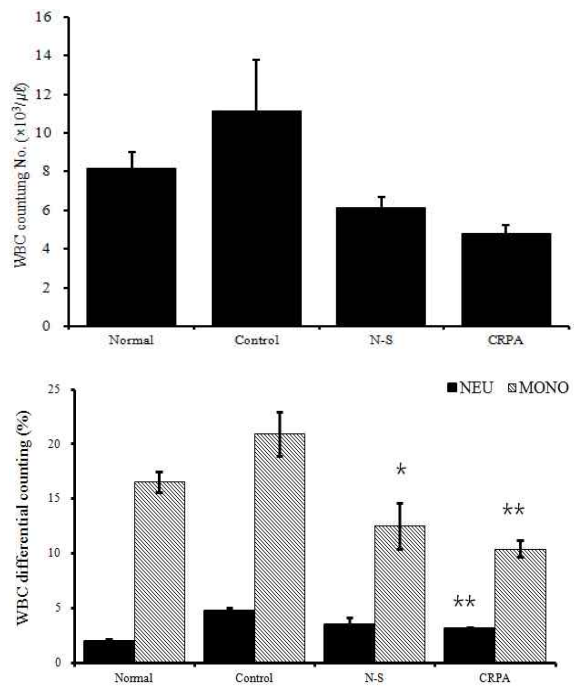


Fig. 3. Effects of CRPA on WBC, neutrophil and monocyte in the blood of MIA-induced osteoarthritis rats

WBC : white blood cell.
 The results were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone.
 Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
 CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.
 * : statistically significant compared with control group ($p < 0.05$).
 ** : statistically significant compared with control group ($p < 0.01$).

에서 38.3 ± 3.4 pg/ml, N-S에서 34.2 ± 4.3 pg/ml, CRPA에서 28.4 ± 2.1 pg/ml로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소한 경향이였으나 유의성은 없었다. CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(* : $p < 0.05$)(Fig. 4).

2) IL-1 β

IL-1 β 생성량은 정상군에서 50.1 ± 10.7 pg/ml, 대조군에서 368.0 ± 37.5 pg/ml, N-S에서 278.8 ± 11.3 pg/ml, CRPA에서 190.7 ± 49.4 pg/ml로 나타났다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(* : $p < 0.05$)(Fig. 4).

3) IL-6

IL-6 생성량은 정상군에서 46.7 ± 6.2 pg/ml, 대조군에서 356.3 ± 13.3 pg/ml, N-S에서 258.4 ± 16.7 pg/ml, CRPA에서 143.1 ± 22.1 pg/ml로 나타났다. N-S는 대조군

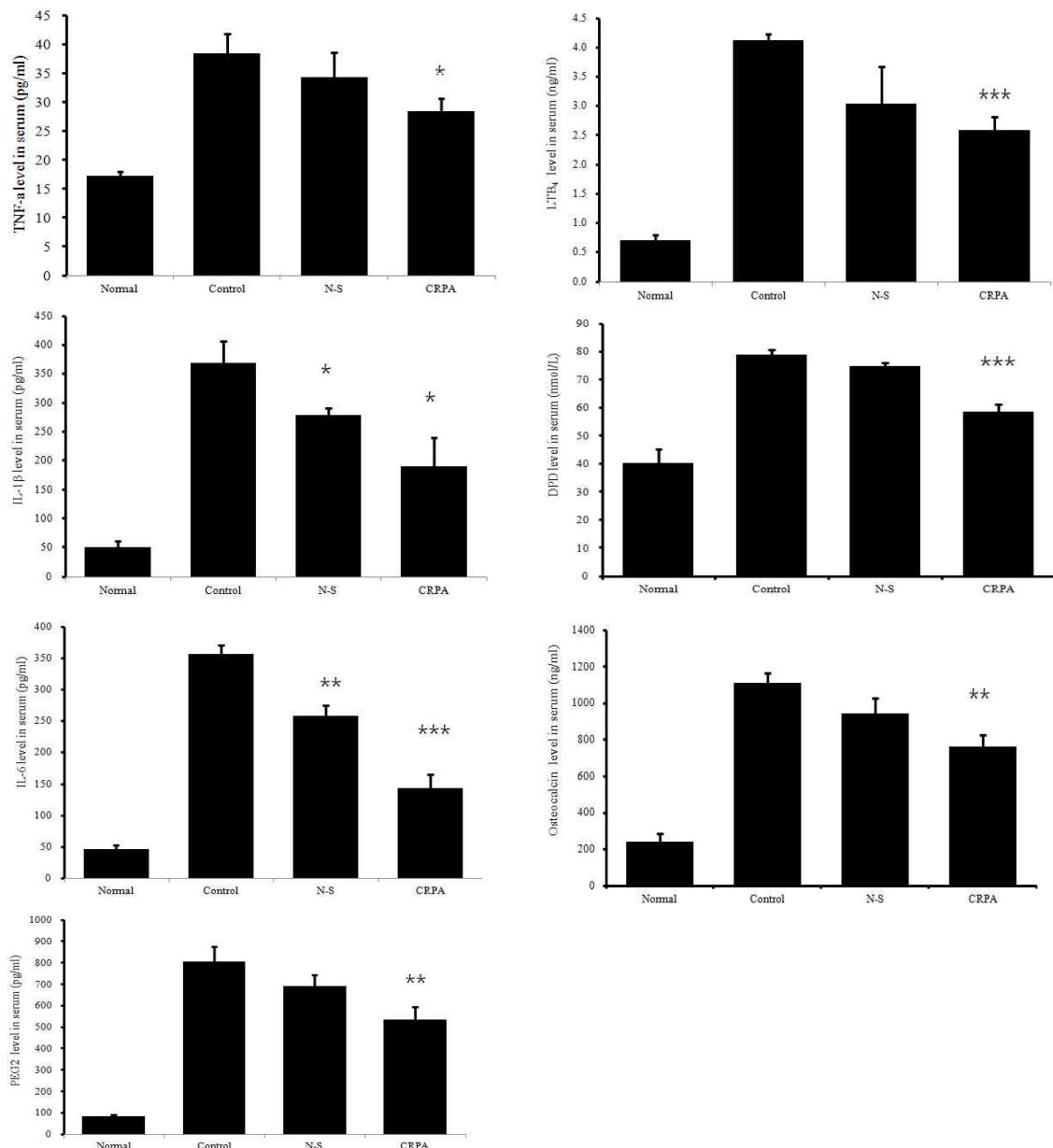


Fig. 4. Effects of CRPA on inflammatory cytokines in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. The results were expressed as mean \pm SD(n=5).
 Normal : rats were no injected with anyone. Control : rats were injected with MIA.
 N-S : rats were injected with MIA and normal saline. CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.
 * : statistically significant compared with control group($p < 0.05$).
 ** : statistically significant compared with control group($p < 0.01$).
 *** : statistically significant compared with control group($p < 0.001$).

에 비해 유의성 있게 감소하였다(**, $p < 0.01$)(Fig. 4). CRPA도 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(*** : $p < 0.001$)(Fig. 4).

4) PGE2

PGE2 생성량은 정상군에서 85.7 ± 5.7 pg/ml, 대조군에서 806.9 ± 68.9 pg/ml, N-S에서 692.0 ± 52.3 pg/ml, CRPA에서 535.0 ± 59.4 pg/ml로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. CRPA

는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(**: $p < 0.01$) (Fig. 4).

5) LTB4

LTB4 생성량은 정상군에서 0.71 ± 0.08 ng/ml, 대조군에서 4.12 ± 0.11 ng/ml, N-S에서 3.04 ± 0.63 ng/ml, CRPA에서 2.59 ± 0.22 ng/ml로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(***: $p < 0.001$) (Fig. 4).

6) DPD

DPD 생성량은 정상군에서 40.5 ± 4.7 nmol/L, 대조군에서 79.0 ± 1.7 nmol/L, N-S에서 74.9 ± 1.2 nmol/L, CRPA에서 58.7 ± 2.4 nmol/L로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(***: $p < 0.001$) (Fig. 4).

7) Osteocalcin

Osteocalcin 생성량은 정상군에서 239.02 ± 44.06 ng/ml, 대조군에서 1109.20 ± 56.23 ng/ml, N-S에서 943.96 ± 84.45 ng/ml, CRPA에서 760.2 ± 66.2 ng/ml로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(**: $p < 0.01$) (Fig. 4).

5. 동물조직의 염증성 단백질 및 유전자 발현 분석

1) 동물조직의 염증성 단백질 분석

(1) COX-2

활액 내 COX-2 함량은 정상군에서 9.6 ± 0.3 ng/ml, 대조군에서 34.6 ± 2.7 ng/ml, N-S에서 31.0 ± 2.2 ng/ml, CRPA에서 23.4 ± 2.6 ng/ml로 나타났다. N-S는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. CRPA는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(*: $p < 0.05$) (Fig 5).

(2) Arachidonate 5 lipoxygenase

활액 내 Arachidonate 5 lipoxygenase 함량은 정상군에서 0.58 ± 0.009 ng/ml, 대조군에서 1.93 ± 0.195 ng/ml, N-S에서 1.47 ± 0.109 ng/ml, CRPA에서 1.42 ± 0.157 ng/ml로 나타났다. N-S와 CRPA는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

2) 유전자 발현 분석

(1) COX-2

활액 내 COX-2 발현량은 정상군에서 0.272 ± 0.143 , 대조군에서 1.290 ± 0.050 , N-S에서 0.938 ± 0.026 , CRPA에서 0.780 ± 0.049 로 나타났다. 대조군에 비해 N-S와 CRPA는 각각 27.3 %, 39.5 % 감소하였다(Fig. 6).

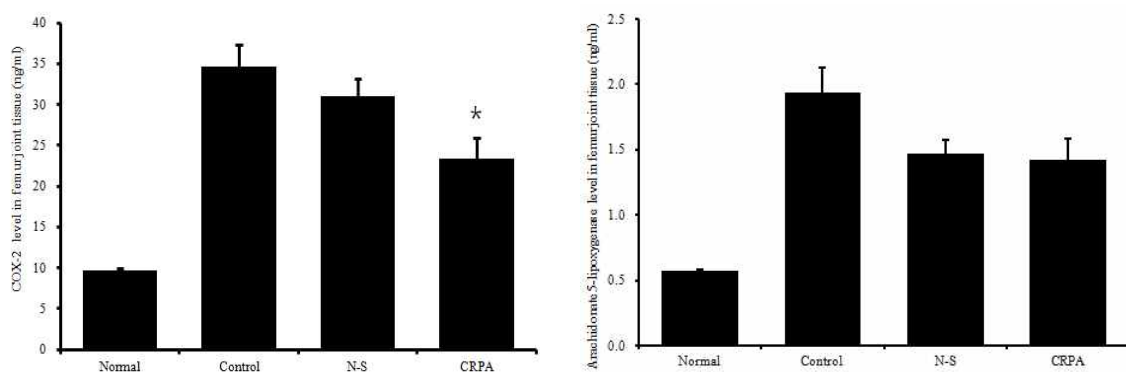


Fig. 5. Effects of CRPA on COX-2 and Arachidonate 5 lipoxygenase content in synovial tissue of MIA-induced osteoarthritis rats

The results were expressed as mean \pm SD(n=5).

Normal : rats were no injected with anyone. Control : rats were injected with MIA.

N-S : rats were injected with MIA and normal saline. CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.

* : statistically significant compared with control group($p < 0.05$).

(2) TNF- α

활액 내 TNF- α 발현량은 정상군에서 0.613 ± 0.313 , 대조군에서 1.048 ± 0.048 , N-S에서 0.965 ± 0.080 , CRPA에서 0.575 ± 0.049 로 나타났다. 대조군에 비해 N-S와 CRPA는 각각 7.9 %, 45.1 % 감소하였다(Fig. 6).

(3) IL-1 β

활액 내 IL-1 β 발현량은 정상군에서 0.530 ± 0.218 , 대조군에서 1.134 ± 0.116 , N-S에서 0.917 ± 0.143 , CRPA에서 0.655 ± 0.143 로 나타났다. 대조군에 비해 N-S와 CRPA는 각각 19.1 %, 42.2 % 감소하였다(Fig. 6).

(4) IL-6

활액 내 IL-6 발현량은 정상군에서 0.187 ± 0.166 , 대조군에서 0.977 ± 0.023 , N-S에서 0.935 ± 0.049 , CRPA에서 0.668 ± 0.055 로 나타났다. 대조군에 비해 N-S와 CRPA는 각각 4.3 %, 31.6 % 감소하였다(Fig. 6).

(5) NOS2

활액 내 NOS2 발현량은 정상군에서 0.164 ± 0.062 , 대조군에서 1.159 ± 0.044 , N-S에서 1.108 ± 0.108 , CRPA에서 0.755 ± 0.031 로 나타났다. 대조군에 비해 N-S와 CRPA는 각각 4.4 %, 34.9 % 감소하였다(Fig. 6).

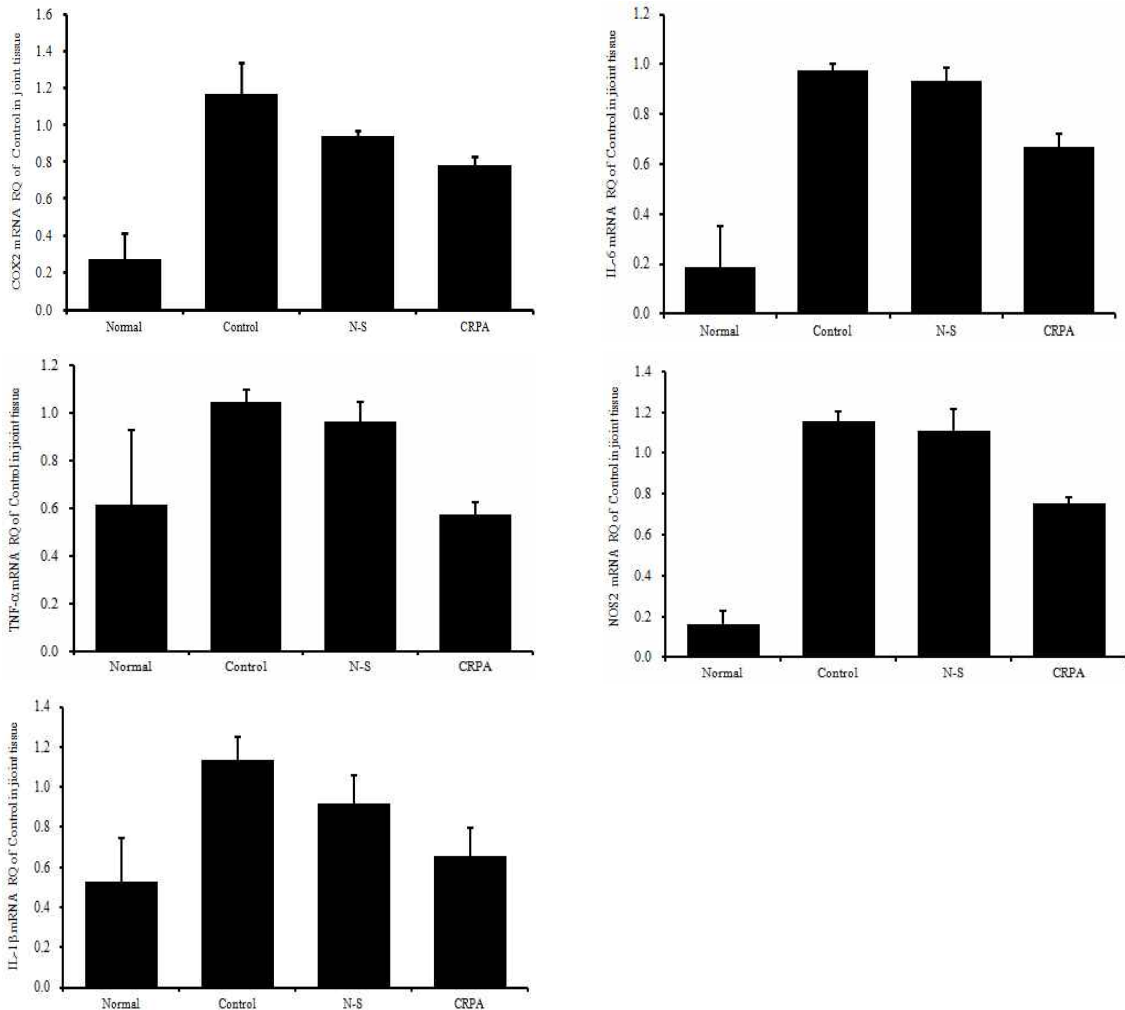


Fig. 6. Effects of CRPA on expression of inflammatory cytokine contents in synovial tissue of MIA-induced osteoarthritis rats

The results were expressed as mean \pm SD(n=2).

Normal : rats were no injected with anyone. Control : rats were injected with MIA.

N-S : rats were injected with MIA and normal saline. CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.

6. 병리조직학적 검사

1) H & E 염색

H & E 조직 염색 후 100배율로 관찰한 결과 정상군 관절의 활막조직과 섬유조직이 정상적으로 관찰되었고 조직의 변형이 없었다. 대조군에서는 골관절염이 유발되어 활막조직 및 섬유조직이 변형되고 손상되었다. N-S 역시 활막조직과 섬유조직에 변형과 손상이 관찰되었다. CRPA에서는 대조군에 비해 연골조직과 활막조직 및 섬유조직의 변형이 개선되었다(Fig. 7).

2) Safranin O 염색

Safranin O 조직 염색 후 100배율로 관찰한 결과 정상군의 관절은 연골조직과 활막조직, 섬유조직이 정상적으로 위치하고 조직의 변형이 없으며 proteoglycan이 붉은색으로 염색되어 있다. 대조군은 조직의 변형과 함께 연골의 붉은색 염색이 없다. N-S에서는 조직의 변형이 일부 관찰되며 재생이 된 proteoglycan 일부분이 붉은색으로 염색되어 있다. CRPA에서는 조직의 변형이 관찰되지 않으며 대조군에 비해 proteoglycan이 붉은색으로 선명하게 염색되었다(Fig. 8).

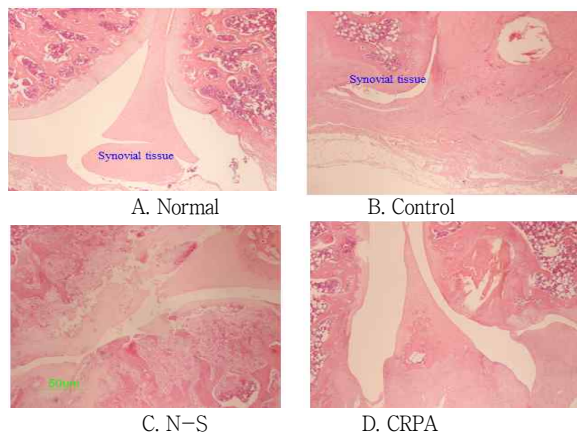


Fig. 7. Effects of CRPA on joint pathology(H & E) in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats

Normal : rats were no injected with anyone.
Control : rats were injected with MIA.
N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.

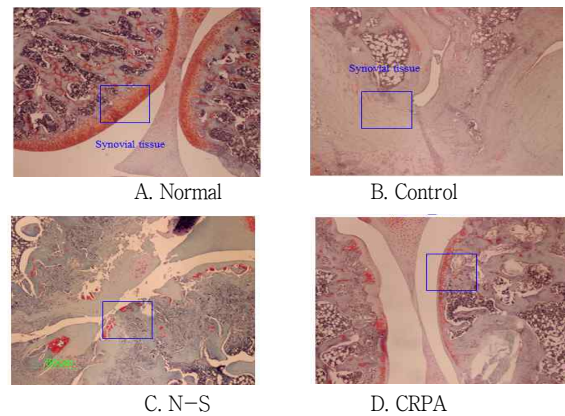


Fig. 8. Effets of CRPA on joint pathology (safranin O staining) in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats

Normal : rats were no injected with anyone.
Control : rats were injected with MIA.
N-S : rats were injected with MIA and normal saline.
CRPA : rats were injected with MIA and *Curculiginis Rhizoma*.

IV. 고 찰

우리나라는 2010년을 기준으로 65세 이상의 인구가 전체 인구의 11%를 넘어 고령화 사회에 진입하였으며, 특히 골관절염은 60세 이상의 여성과 남성 모두에서 고혈압에 이어 두 번째로 유병률이 높은 만성질환으로, 보건의료 분야에서 중요성이 크다⁴⁾. 골관절염 치료에는 약물치료와 물리적 요법, 수술치료, 주사치료 등이 있으나⁵⁾, 완치시킬 확실한 방법은 아직 없으며, 치료 목적도 환자의 통증을 경감시켜주고 관절의 기능을 유지시키며 변형을 방지하는 데 있다²⁾.

한의학에서 관절염은 痺症, 歷節風, 鶴膝風 등의 범주에 속하며, 노인들은 陽氣가 부족하면 表衛가 不固하므로 外邪가 쉽게 침습하게 되어 관절이 아프게 된다. 邪氣가 오래도록 머무르면 氣血이 失養하여 屈伸不利, 關節僵硬, 筋肉萎縮이 나타나며 肝腎虧虛한 상태가 된다^{1,6)}. 관절염에 대한 한의학적 치료 방법 중 약침요법이 최근에 다용되고 있듯이^{1,5,7,8)}, 본 연구에서는 흰쥐를 MIA로 슬관절에 퇴행성 관절염을 유발한 후 仙茅약침액을 족삼리에 시술한 효과를 알아보고자 하였다.

MIA 모델은 연골 내 해당과정을 억제하여 연골세포자멸로 골관절염을 유발시키는 모델로 연골괴사, 관절연골 두께의 감소, 연골표면의 섬유화, 연골하골의 괴사, 변성과 부종 등이 특징인 사람의 골관절염 과정과 비슷하다⁷⁻¹⁹⁾.

약침요법은 經絡 穴位의 치료 작용을 유발하고 약물의 약리작용과 주사방법을 병용시켜 형성된 독특한 요법으로 침

술의 신속성, 한약의 안정성과 유효성이 상승작용을 하며 직접 나타나는데 이러한 효능은 다양한 질환에서 특수한 효과를 나타낸다.²⁰⁾ 임상에서 특히 근골격계 질환을 중심으로 활용도가 높으며, 이에 따라 골관절염을 포함한 근골격계 질환에 대한 약침요법에 대한 연구도 진행되고 있다²¹⁾.

仙茅(*Curculiginis Rhizoma*)는 수선화과에 속하는 多年生 宿根草本인 仙茅 *Curculigo orchoides*의 根莖를 건조한 것으로 性味가 辛熱하고 性猛하여 腎經으로 들어가 腎陽을 補하는 약이 되어 命門을 補하여 陽道를 發興하게 하고 寒濕을 제거하여 무릎을 온난하게 한다. 그러므로 腎虛陽萎와 火衰精寒 및 關節炎等의 병증을 치료하는데 다용된다⁹⁾.

족삼리(ST₃₆)는 胃經絡으로 理脾胃 효과가 있으며 調和氣血, 補虛弱, 利腸消滯, 疏風化濕, 通經絡, 扶正培元 등의 효과가 있어, 鶴膝風, 痺症, 歷節風, 脚氣 등에 활용된다^{22,23)}.

이에 본 연구는 골관절염을 유발하지 않은 정상군, MIA로 골관절염을 유발한 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군, MIA로 골관절염을 유발한 후 각각 생리식염수와 仙茅약침을 患側 족삼리에 시술한 N-S와 CRPA로 나누어 총 4군을 비교하였다.

체중의 변화는 N-S군과 CRPA는 대조군에 비해 실험 7일부터 14일까지는 체중이 감소하였고, 실험 21일에는 체중이 증가하였으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 1).

체중부하 검사는 관절염이 유발된 다리 쪽으로 체중을 실지 않으려는 행동을 이용한 검사법으로, 단순한 행동관찰보다 객관적으로 통증의 정도를 확인할 수 있다는 장점이 있다²⁴⁾. CRPA는 실험 14일부터 21일까지 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 이로 인하여 골관절염으로 인한 통증이 감소하였다고 판단할 수 있었다(Table 2, Fig. 1).

간 기능과 신장 기능에 영향을 주는지 알아보기 위해 AST, ALT, creatinine 농도를 측정한 결과 仙茅약침이 대조군에 비해 간 및 신장의 독성에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

골관절염의 발생과정은 연골기질의 손상 또는 변화와 이에 대한 연골세포의 반응 그리고 세포반응의 감소 과정을 통하여 일어난다. 이화작용 및 파괴에 관여하는 효소로는 IL-1 β 와 TNF- α ²⁵⁾로 IL-8, IL-6, PGE₂, 일산화질소 등의 분비를 증가시키며 이들은 연골감소를 일으킨다^{26,27)}. 연골 기질로부터 당단백(glycoprotein)의 소실률을 증가시키고 재합성을 억제하여 기질 성분의 상실이 일어난다. 또 일산화질소는 연골세포에 작용하여 단백질당과 교원질의 합성을 억제하고 COX-2의 합성을 촉진시키며 아라키돈산으로부터 PGE₂의 전환을 유도한다²⁸⁾. 아라키돈산의 대사과정 중에 다른 부산물인 LTB₄와 함께 PGE₂는 윤활막에서 염증성 cytokine을 분비하며 염증을 일으킨다^{2,29-31)}.

본 연구에서 仙茅약침이 염증 cytokine 및 염증 매개인자 생성에 미치는 영향을 알아보기로 분석한 결과 CRPA가 대조군에 비해 백혈구는 감소하였으나 유의성은 없었으며 호중구와 단핵구, 그리고 염증 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, LTB₄는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3, 4). 이러한 결과는 仙茅약침이 관절 내 연골세포의 손상과 변형, 염증반응을 억제하며 골관절염의 진행 역시 억제하는 것으로 판단할 수 있다.

N-S에서는 단핵구와 염증 cytokine인 IL-1 β , IL-6가 유의성 있게 감소하였으며 백혈구와 호중구, 그리고 염증 cytokine인 TNF- α , PGE₂, LTB₄는 감소하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다(Fig. 3, 4). N-S에서는 仙茅약침처럼 실험한 항목에서 뚜렷한 감소를 보이지는 않았으나 일부 염증반응을 억제하는 것으로 판단할 수 있는데, 이는 족삼리 자극이 그 이유일 것으로 추정된다.

DPD는 대부분 뼈에 주로 존재하며 골 대사 중에서 골흡수에 유용한 marker이며³²⁾ osteocalcin은 파골세포활동을 반영하는 골조직 생성 표지자이다^{33,34)}. 본 연구에서 CRPA에서 DPD와 osteocalcin 역시 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이는 仙茅약침이 연골기질손상이나 파골세포를 억제하는 것으로 사료된다. N-S에서는 DPD와 osteocalcin이 감소하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다(Fig. 4).

염증성 단백질을 분석한 결과 CRPA에서 활액 내 COX-2 함량은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. Arachidonate 5 lipoxygenase 함량은 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5). 그러므로 仙茅약침이 염증성 단백질 생성을 감소시키는 효과를 확인할 수 있었다. N-S에서는 COX-2와 arachidonate 5 lipoxygenase가 감소하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다(Fig. 5).

유전자 발현분석 결과는 CRPA에서 COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS2가 대조군에 비해 감소하였다. 仙茅약침이 혈청뿐만 아니라 활액 내 단백질, 유전자 발현에도 효과가 있었다. N-S도 COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS2는 대조군에 비해 감소하였지만 유전자 발현에 미치는 영향은 仙茅약침에 비해 적었다(Fig. 6).

Proteoglycan은 proteoglycan membrane을 형성하여 관절면을 보호하고 연골의 영양을 공급한다³⁵⁾. 병리조직학적 검사에서는 28일째에 조직을 채취하여 H & E 및 Safranin O 염색 결과 CRPA는 활막의 손상정도가 감소하였고 proteoglycan의 생성은 증가하였다. N-S는 H & E 및 Safranin O 염색 결과 조직의 변형과 손상이 심하였고 일부 재생된 proteoglycan이 확인되었다(Fig. 7, 8).

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 족삼리의 仙茅약침이 관절염 유발부위의 통증을 감소시키고 활액 내 염증 cytokine

및 염증 매개 인자 생성을 억제하고 염증성 단백질 물질을 억제하며 염증성 유전자 발현 역시 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 병리조직학적으로는 활막의 손상을 감소시키고 연골을 생성하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 족삼리에 생리식염수를 시술한 N-S도 염증반응을 일부 억제하지만 연골기질손상이나 파골세포, 단백질 발현에서는 영향력이 적었다. 이는 생리식염수의 영향이라기보다 주입한 족삼리의 자극에 의한 영향으로 보인다. 결과적으로 단순한 족삼리 자극과 비교하여도 仙茅약침의 족삼리 자극은 더 좋은 결과를 보였다. 이로 미루어 보아 골관절염에 족삼리 자극과 仙茅약침의 적절한 응용은 치료에 많은 효과가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

족삼리의 仙茅약침이 골관절염에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 MIA로 유발한 골관절염 흰쥐를 이용하여 동물행동학적 반응평가, 안정성, 혈청 내 염증 cytokine 및 염증 매개인자 생성, 염증성 단백질 및 유전자 발현, 병리조직학적 변화 등을 관찰한 결과 CRPA에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 변화는 각 군 간에 유의성이 없었다.
2. 뒷다리에 체중을 부하하는 정도가 유의성 있게 증가하였다.
3. AST, creatinine은 유의성 있게 감소하였고, ALT는 유의성이 없었다.
4. 혈청 내 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, LTB₄, DPD, Osteocalcin은 유의성 있게 감소하였다.
5. COX-2 단백질은 유의성 있게 감소하였다. Arachidonate 5 lipoxygenase 단백질은 감소의 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다.
6. COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS2의 유전자 발현은 감소하였다.
7. 병리조직학적 소견에서 활막의 손상 정도가 감소하였고 proteoglycan의 생성은 증가하였다.

이상과 같이 족삼리의 仙茅약침은 항염증효과가 있으며 MIA로 유발한 생쥐의 골관절염에서 통증 및 염증 cytokine 과 염증 매개 인자, 염증성 단백질, 유전자 발현, 연골 변형의 억제가 실험적으로 관찰된 바, 골관절염 치료에 유효하다고 사료된다.

VI. References

1. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society Textbook Compilation Committee. Acupuncture & Moxibustion Medicine. Gyeonggi : Jipmoondang. 2012 : 230, 549-64, 577-84.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopedixs. The 7th Edition. Seoul : Newest Medicine Company. 2013 : 49-50, 99-100, 317-26, 1012-4.
3. Kang MK, Nam SS, Lee YH. The study on acupuncture for osteoarthritis. The Acupuncture. 2003 ; 20(2) : 18-28.
4. Korean Pharmacopuncture Institute, Pharmacopuncture Medical Mnstitute. Pharmacopunctureology. Seoul : Elsevierkorea. 2011 : 3-8.
5. Kim WY, Choi JB. Effects of bee venom and cervi cornu parvum pharmacoacupuncture in monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritis rat. JKMR. 2010 ; 20(1) : 61-77.
6. Lee OJ, Lee DG, Lee JH et al. Effects of *Curcuma Longa* linne pharmacopuncture at ST₃₆ on adjuvant induced arthritis in rats. The Acupuncture. 2013 ; 30(4) : 95-105.
7. Koo MS, Yoon JH, Kim KH, Jang JH, Lee SD, Kim KS. The effect of *Bupleuri Radix* herbal-acupuncture solution on immune responses to adjuvant induced arthritis in mice. The Acupuncture. 2002 ; 19(3) : 51-63.
8. Bae CW, Kim KH, Hwang HS, Kim YS. Effect of *Strychni Semen* aqua-acupuncture in rats with arthritis induced by freund's complete adjuvant. The Acupuncture. 2001 ; 18(1) : 217-25.
9. Korean Medicine Teaching Meterial Editing Committee. Herbology. Seoul : Youngrimsa. 2011 : 601.
10. Ku SK, Kim JS, Seo YB et al. Effect of *Curculigo Orchioides* on reflux esophagitis by suppressing proinflammatory cytokines. The American Journal of Chinese Medicine. 2012 ; 4(6) : 1241-55.
11. Roh SS. Effects of *Curculiginis Rhizoma* on anti-thrombotic activity. Korean Journal Herbology. 2011 ; 26(4) : 124-32.
12. Wang ZQ, Li JL, Sun YL et al. Chinese herbal

- medicine for osteoporosis: a systematic review of randomized controlled trails. E-CAM. 2013. Available from : <http://dx.doi.org/10.1155/2013/356260>.
13. An JU, Yu GY. Statistical analysis of biomedical data. Seoul : Hannarae. 2007 : 312-78.
 14. Kim HR. Prevalence and risk factors of osteoarthritis among women and men elderly people in Korea. Korea Gerontological Society. 2013 ; 33(4) : 805-20.
 15. Yoon CH. Current clinical practice: osteoarthritis update. Korean Journal of Medicine. 2012 ; 82(2) : 170-4.
 16. Kim MJ, Yoon JH, Kim KH, Lee SD, Kim KS. Acupuncture therapy literature study on the knee rheumatoid arthritis. The Acupuncture. 2005 ; 22(1) : 191-201.
 17. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA et al. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. Osteoarthritis Cartilage. 2001 ; 9(8) : 751-60.
 18. Wang XD, Kou XX, He DQ et al. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate. PLoS One. 2012 ; 7(9) : e45036. Published online Sep 11, 2012. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439407/pdf/pone.0045036.pdf>.
 19. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. Molecular Pain. 2007 ; 3 : 8. Available from : <http://www.molecularpain.com/content/3/1/8>.
 20. Lee HJ. Introduction and clinic of pharmacopuncture. Seoul : Iljungsae. 1999 : 16-8.
 21. Baik SI, Ahn JC, Kim YJ, Kim HS, Kwon KR. Type analysis of pharmacopuncture papers published in the journal of Korean acupuncture and moxibustion. The Acupuncture. 2006 ; 23(6) : 19-27.
 22. An YG. *Gyuonghulhakchongseo*. Seoul : Seongsobosa. 2002 : 196-7.
 23. Kim JC, Lee EY, Seo IB, Koo ST, Choi SM, Kim EW. Effects of low frequency electro-acupuncture(ST₃₆) on the adjuvant-induced arthritis in rats. The Acupuncture. 2006 ; 23(6) : 207-19.
 24. Lee YS. Behavioral and histological changes of monosodium iodoacetate(MIA) induced osteoarthritis in rats. Seoul : Korea Univ. 2008. Korean.
 25. Stannus O, Jones G, Cicuttini F et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. Osteoarthritis and Cartilage. 2010 ; 18(11) : 1441-7.
 26. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. Arthritis & Rheumatism. 2006 ; 54(1) : 158-68.
 27. Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. clinical immunology. 2013 ; 146(3) : 185-96.
 28. Chen SH, Fahmi H, Shi Q, Benderdour M. Regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes. Arthritis Research & Therapy. 2010 ; 12 : R21. Available from : <http://arthritis-research.com/content/12/1/R21>.
 29. Park JH. Pathophysiology of articular cartilage injury. J Korean Orthop Sports Med. 2005 ; 4(1) : 6-11.
 30. Caroline Bélanger, Hanan Elimam, Julie Lefebvre, Pierre Borgeat, Sylvie Marleau. Involvement of endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in polymorphonuclear leucocyte recruitment to dermal inflammatory sites in rats. Immunology. 2008 ; 124(3) : 295-303.
 31. M Lotz, J Martel-Pelletier, C Christiansen et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. Annals of the Rheumatic Diseases. 2013 ; 72(11) : 1756-63.
 32. M Takahashi, K Kushida, H Hoshino et al. Concentrations of pyridinoline and deoxypyridinoline in joint tissues from patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 1996 ; 55(5) : 324-37.

33. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1988 ; 226(1) : 267–91.
34. A Fairney, K V Patel, N P Hollings, MH Seifert. Abnormal osteocalcin binding in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1990 ; 49(4) : 229–30.
35. Mary KC, Shawn OF. *Biochemistry*. The fifth edition. Seoul : Life Science Publishing Company. 2007 : 451.