

加味桂芍知母湯藥鍼이 퇴행성관절염 병리인자 및 동물병태 모델에 미치는 영향

이현재 · 박정오 · 오민석
대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Anti-inflammation and Anti-oxidation Effects of *Gamikyejakjimo-tang* Herbal Acupuncture on Pathologic Factor and MIA-induced Osteoarthritis Rat

Hyun-Jae Lee, K.M.D., Jung-Oh Park, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.
Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Dae-jeon University

Objectives This study was intended to clarify the anti-inflammation and anti-oxidation effects of *gamikyejakjimo-tang* herbal acupuncture (GKHA) for osteoarthritis.

Methods Osteoarthritis was induced by injection of MIA into right knee joint cavities of rats. Rats were divided into a total of 4 groups (n=8). The 4 groups were normal group, control group, positive comparison group and experimental group. Indomethacin and GKHA were medicated for a total of 4 weeks. After that, functions of liver and kidney by AST, ALT, creatinine, BUN, DPPH and ABTS free radical scavenging activity, ROS (reactive oxygen species) production, NO (Total Nitric oxide), IL-1 β , IL-6, TNF- α production, weight changes in the hind legs of MIA-induced osteoarthritis rat, serum PGE2, TIMP-1, MMP-2, MMP-9, LTB4, hs-CRP, and white blood cells, neutrophils, lymphocytes, monocytes were measured. The volume of cartilage was observed by micro CT arthrography. H&E and Safranin-O staining were used to examine the injury of synovial tissue.

Results 1. In the hind leg weight bearing measurement, level of weight was increased. 2. AST, ALT, BUN, creatinine were decreased. 3. The production of total white blood cell was decreased, and the production of neutrophils, lymphocytes, monocytes were significantly decreased. 4. The production of NO, PGE2, TIMP-1, MMP-2, MMP-9, LTB4 were significantly decreased, and the production of hs-CRP was also decreased but with no significance. 5. The cartilage volume was significantly increased. 6. In H&E staining and Safranin-O staining, the cartilage cell appeared to be proliferated, and proteoglycans appeared to be increased.

Conclusions Based on the results above, *Gamikyejakjimo-tang* Herbal Acupuncture has anti-oxidation and anti-inflammation effects, which leads to suppressing the underlying causes and the progression of osteoarthritis. (J Korean Med Rehab 2015;25(4):1-20)

RECEIVED September 17, 2015
REVISED October 2, 2015
ACCEPTED October 12, 2015

CORRESPONDING TO
Min-Seok Oh, Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Dae-jeon University, 1136, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 35235, Korea

TEL (042) 470-9424
FAX (042) 254-3403
E-mail ohmin@dju.ac.kr

Copyright © 2015 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Kyejakjimo-tang*, *Gamikyejakjimo-tang* Herbal Acupuncture (GKHA), Osteoarthritis, Cartilage volume, Anti-inflammation, Anti-oxidation

서론»»»»

골관절염은 퇴행성 관절염 또는 퇴행성 관절질환이라고도 불리며, 국소 관절에 점진적인 관절연골의 소실 및 그와 관련된 2차적인 변화와 증상을 동반하는 질환이다¹⁾.

주로 관절 연골의 국소적 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 골형성, 관절의 변형을 특징으로 하며²⁾, 예전에는 가장 중요한 원인이 노령화에 따른 단순 퇴행성 변화라고 생각했지만 최근에는 여러 연구로 인해 수많은 요인들이 관여하는 것으로 인식되고 있다³⁾.

2012년 국민건강영양조사통계⁴⁾에 의하면 연령별 골관절염 유병률은 남자 50대에서 4.5%, 60대 5.5%, 70대 20.0%였고, 여자는 50대 15.4%, 60대 32.8%, 70대 65.2%로 남녀 모두 연령이 높아질수록 유병률이 급격히 증가하고 있으며, 향후 노령화 시대와 더불어 골관절염의 유병률은 더욱 더 증가할 것으로 예상된다.

한의학에서 골관절염은 痺證의 범주에 속하며 膝痛, 膝疼痛, 膝腫, 鶴膝風, 膝痺 등으로 표현되는데, 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱시 經絡에 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利 등을 초래한다. 氣血宣通을 治法으로 하여, 熱者는 清之하고, 寒者는 溫之하며, 濕痰瘀 등의 有形之邪는 去之하고, 虛者는 溫通溫散하거나 滋陰한다²⁾.

골관절염의 치료목적은 변형의 예방과 교정, 기능의 보존 및 회복, 통증에 완화에 있으며 서양 의학적 치료는 소염진통제, 연골보호제 등의 약물치료와 비약물치료를 병행하나⁵⁾, 소염진통제를 장기 복용 시 위장관 장애 등을 일으킬 우려가 있으며⁶⁾, 인공관절 치환술 또한 많은 합병증을 유발할 수 있다⁷⁾. 골관절염의 한의학적 치료에 대한 연구로는 침구치료^{8,9)}, 약침¹⁰⁻¹⁵⁾, 약물¹⁶⁻²¹⁾ 등을 시행하여 진통 및 항염증 효과를 입증하고 있으며 그 중 약물 연구에 있어서는 연골 세포의 보호 및 재생 입증에 초점을 두고 있다.

桂芍知母湯은 白朮, 附子, 甘草, 白芍藥, 桂枝, 麻黃, 生薑, 防風 및 知母 등으로 구성되며 「金匱要略」²²⁾에서 “祛風散寒除濕하고 清熱한다” 하여 임상에서는 류마티스성 관절염이나 통풍 등의 치료 목적으로 사용되고 있으며²³⁾, 홍 등²⁴⁾은 실험을 통해 桂芍知母湯을 경구투여가 조직면역학적으로 골관절염에 유효함을 입증하였다.

이에 저자는, 桂芍知母湯의 골관절염에 대한 효과를 더욱 증진하고자 散瘀血, 消癰腫, 強筋骨하는 牛膝²⁵⁾과 祛風除濕, 通絡止痛하는 威靈仙²⁵⁾을 加味하여 加味桂芍知母湯藥鍼(GKHA) 제조한 후, LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 염증 유발 인자를 측정하고, MIA로 유발된 rat의 혈액 내 면역세포, 뒷다리 체중부하, cartilage volume 및 조직병리학적 검사 등을 실시한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법»»»»

1. 재료

1) 세포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 加味桂芍知母湯(Gamikyejakjimo-tang 이하, GK로 표기)의 구성 약재들은 (주)유니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였고, 대전대학교 traditional and biomedical research center-regional innovation center (TBRC-RIC)에서 확인 후 정성해서 사용하였다. 「金匱要略」²²⁾을 바탕으로 용량을 가감하였으며 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table I).

Table I. The Prescription of GK

Herb name	Pharmacognostic nomenclatures	Amount (g)
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	12
威靈仙	Clematidis Radix	9
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	6
乾薑	Zingiberis Rhizoma	6
桂枝	Cinnamomi Ramulus	6
麻黃	Ephedrae Herba	6
防風	Saposhnikoviae Radix	6
牛膝	Achyranthis Radix	6
芍藥	Paconiae Radix	6
知母	Anemarrhenae Rhizoma	6
附子	Aconiti Lateralis Radix Preparata	4
Total amount		73

3) 동물

수컷 6 주령의 SD-Rat (170~200 g)을 (주)라온바이오사 (Yongin, Korea)에서 공급받아 실험하였다. 동물은 실험 당일까지 일반 고형사료를 (주)푸리나사료(Seongnam, Korea)에서 공급받아 충분히 투여하여 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대 동물 실험윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호 -DJUAR2014-027)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험 하였다.

4) 시약 및 기기

(1) 시약

Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich사 (st. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone사(Logan, Ut, USA)에서, Cell viability assay kit은 Daeillab sevice사(Seoul, Korea)에서, Nitric Oxide detection kit는 Intron Biotechnology사 (Suwon, Korea), monosodium iodoacetate (Sigma, USA)에서 구입하였다. 중금속 분석을 위한 HNO₃는 Duksan 사(Ansan, Korea)에서, As, Pb, Hg, Cd standard solution은 SCP Science사(Quebec, Canada)에서 구입하였고, Folin-Giocalteu's phenol reagent는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서, gallic acid와 sodium carbonate는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Cytokine Milliplex Map Immunoassay kit은 Millipore사(Billerica, MA, USA)에서, Rat Total MMP-2, Rat Total MMP-9, LTB₄, Prostaglandin E2 ELISA Kit, Rat TIMP-1 Kit, Rat IL-6 Kit, Rat TNF- α Kit, Rat IL-1 β Kit 은 R&D System 사(Minneapolis, USA), Rat GAG ELISA Kit은 MyBioSource 사(San Diego, USA)에서, 주정추출에 이용된 주정은 (주)주정판매월드(Jeonju, Korea)에서 구입하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator는 RikaKikai Co. (Tokyo, Japan), freeze dryer는 IlShin Co. (Yangju, Korea), ELISA reader는 Molecular Devices Co. (CA, USA), Luminex는 Millipore Co. (MA, USA), induc-

tively coupled plasma (ICP)는 Shimadzu Co. (Kyoto, Japan), 수은분석기(Teledyne Leeman Labs. (NH, USA), 유세포분석기(Flow cytometry system)는 BD Biosciences immunocytometry systems Co. (San Jose, CA, USA), Incapacitance Test Meter는 IITC Life Science Co. (CA, USA), Light Microscope는 Carl ZEISS Co. (Oberkochen, Germany), 자동혈구측정기(Diamond Diagnostics, USA), Micro CT arthrography (Brucker, Germany)를 이용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

GK 1첩에 80% 주정 1,000 ml을 넣고 3시간동안 환류 추출 하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축하여 동결건조 하였다. 완전 건조된 GK (13.7 g)를 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 약침액의 조제

GK 1첩을 80% 주정으로 환류추출 한 여액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압 농축하였다. 농축된 여액에 90% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 침전물이 생성되게 한 다음 여과하고, rotary evaporator로 감압농축한 후 다시 여과하였다. 여과된 농축액에 80% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 실온에서 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 그 여과액에 70% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 실온에서 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 과정을 2회 반복하였다. 마지막으로 추출 된 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압농축하여 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 최종적으로 얻어진 농축액 20 ml을 1N NaOH를 이용하여 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C 에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering하였다. 필터링 되어진 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 加味桂芍知母湯藥鍼 (Gamikyekajjimo-tang Herbal Acupuncture 이하, GKHA로 표기)으로 사용하였다.

3) 항산화능 측정

(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 주정에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μ l와 GK 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 증류수를 넣었으며, DPPH 용액 대신 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 자유라디칼을 50% 소거할 수 있는 농도(IC50)로 나타내었다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(2) ABTS radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. SM 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (μ 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 μ l와 SM 추출물을 각각 5 μ l 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(3) 세포내 ROS 활성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 Raw 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양 한 후, GK 주정 추출물 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후,

1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후, DCF-DA 10 μ M이 되도록 첨가하여 15 분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5 분간 원심 분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μ l를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

4) 항염증 효능 측정

(1) Total Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cells은 96 well plates에 104 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, GK 주정 추출물 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50 μ l를 각 well에 처리한 후, 10 분간 상온에서 암소 반응 후, N2 buffer 50 μ l를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(2) 사이토카인 생성량 측정

Raw 264.7 cells을 12 well plates에 1.5×10^5 cells/ml이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, GK 주정 추출물 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 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.

5) 관절염 유발 및 실험군 분류

8 주령의 rat를 마취하여 오른쪽 무릎 관절 주변을 깨끗이 제모한 후, 골관절염 유발물질인 MIA : Monosodium iodoacetate (Sigma, Chemical Co. Ltd, Cat. No. I2512)를 인슐린 주사기를 사용하여 오른쪽 무릎관절강 내에 50 μ l (60 mg/ml)씩 투여하였다. MIA 희석시에는 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,

Indomethacin을 투여한 양성대조군, GKHA를 투여한 실험군으로 분류한 총 4그룹으로 각각 8마리씩 분류하였다.

6) 검액투여

SD-Rat에 MIA를 주사하여 관절염을 유발시킨 후, 일주일 이 경과된 이후부터 양성대조군인 Indomethacin 경구 투여군은 매일 1회 2 ml (200 mg/kg) 씩 투여하였고, 대조군과 실험군에는 각각 증류수와 5% GKHA를 委中穴에 200 μ l 씩 매주 격일로 3회, 오전 10시에 총 4주간 투여하였다.

7) 체중부하측정

뒷발 체중부하는 Incapacitance Test Meter (IITC Life Science, California, USA)를 이용하여, 플라스틱 방에 비스듬히 세운 후 각 뒷발에 가해진 세기는 10초에 걸쳐 평균산출하였다. 처치된 환측의 뒷발에 분포된 체중의 백분율은 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산하였다.

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

8) 혈액학적 분석

최종 실험 종료 후 EDTA 처리된 튜브형 주사기로 심장 혈액 10 ml를 채혈하였다. 그 중 전혈과 혈청을 서울 의과학연구소에 의뢰하여 총 백혈구, 백혈구 중 호중구, 단핵구, 림프구와 AST, ALT, creatinine, BUN, hs-CRP를 측정하였다. 혈구세포 수는 심장 천자법으로 채취한 혈액을 자동혈구측정기(MS9-5, MELET SCHLOESING, France)로 Fonio법에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

9) 염증 사이토카인 및 인자 ELISA 측정

혈청 내에서 염증성 사이토카인을 측정하기 위하여 luminex와 ELISA를 사용하였다. 혈액을 채취하여 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하고, ELISA를 사용하여 NO, PGE2, TIMP-1, MMP-2, MMP-9, LTB4를 측정하였다.

10) Micro CT-arthrography 측정

Micro-CT 측정은 연세대학교 의료공학연구원 전산의용생체공학연구실 측에 의뢰하여 실시하였으며, 조형제인

헥사브릭스(HEXABRICS 320)를 꼬리 정맥에 주사 후 Micro-CT-arthrography를 사용하여 무릎관절의 연골량(cartilage volume)을 측정 및 분석하였다.

11) 조직병리학적 검사

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

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과»»»»

1. 항산화효능에 미치는 영향

1) DPPH radical 소거능에 미치는 영향

GK 주정 추출물의 DPPH 소거율은 대조군에 비하여 1 μ g/ml 농도에서 $9.0 \pm 0.6\%$, 10 μ g/ml 농도에서 $13.7 \pm 1.0\%$, 100 μ g/ml 농도에서 $31.7 \pm 1.6\%$, 1,000 μ g/ml 농도에서 $81.1 \pm 1.9\%$ 로 나타나, 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

2) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

GK 추출물의 ABTS 소거율은 대조군에 비하여 1 μ g/ml 농도에서 $0.5 \pm 1.7\%$, 10 μ g/ml 농도에서 $2.6 \pm 0.7\%$, 100 μ g/ml 농도에서 $29.9 \pm 1.2\%$, 1,000 μ g/ml 농도에

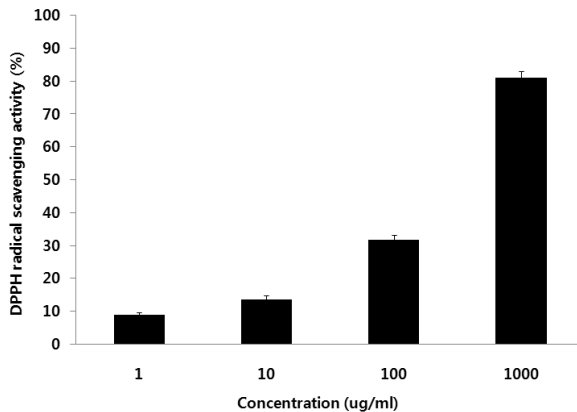


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of GK extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results are expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

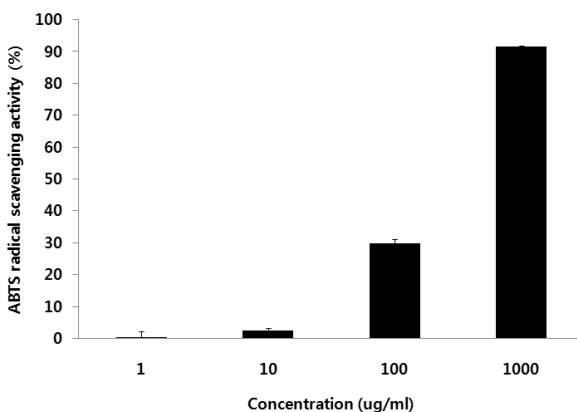


Fig. 2. ABTS free radical scavenging activity of GK extract at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

서 91.8±0.1%로 나타나, 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였다(Fig. 2).

3) ROS 생성 저해 활성에 미치는 영향

GK 주정 추출물의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 100.0±8.8%로 나타냈을 때, 정상군은 15.9±2.7%, GK 투여군은 1 µg/ml 농도에서 95.5±4.6%, 10 µg/ml 농도에서 82.7±4.0%, 100 µg/ml 농도에서 80.6±3.5%로 나

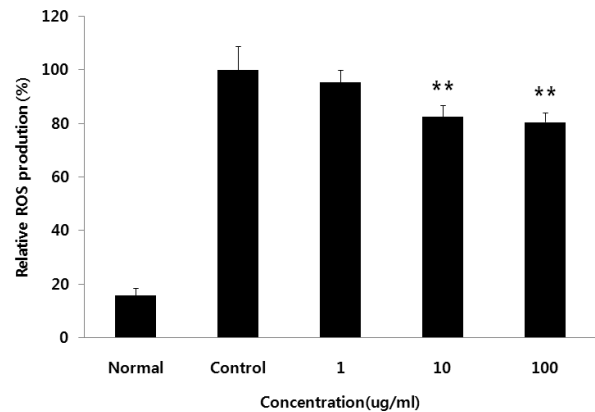


Fig. 3. Effects of GK extract on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium, GK (1, 10, 100 µg/ml) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results were presented by the mean ± S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

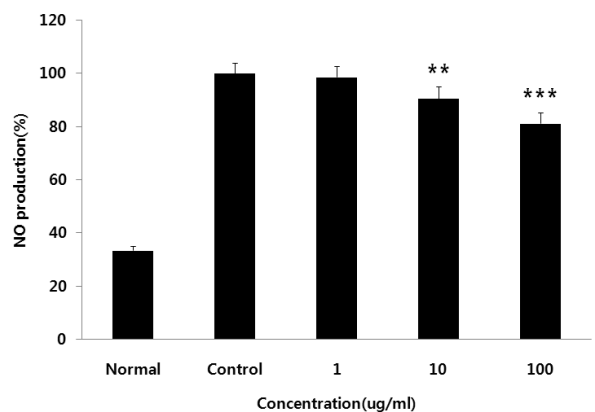


Fig. 4. Effects of GK extract on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 µg/ml) and 0, 10, 10, 100 (µg/ml) of GK for 24 hours. The results were presented by the mean±S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

타나, 대조군에 비해 10 µg/ml 농도와 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

2. 항염증 효능에 미치는 영향

1) NO 생성률

GK 주정 추출물의 NO의 생성 억제율을 대조군이 100±3.9%로 나타냈을 때, 정상군은 33.5±1.6%, GK 투

여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $98.7 \pm 4.0\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $90.5 \pm 4.8\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $81.2 \pm 4.2\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

2) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포내 IL-1 β 생성량을 측정된 결과, 대조군이 12.4 ± 1.8 pg/ml, 정상군이 8.3 ± 0.2 pg/ml, GK 투

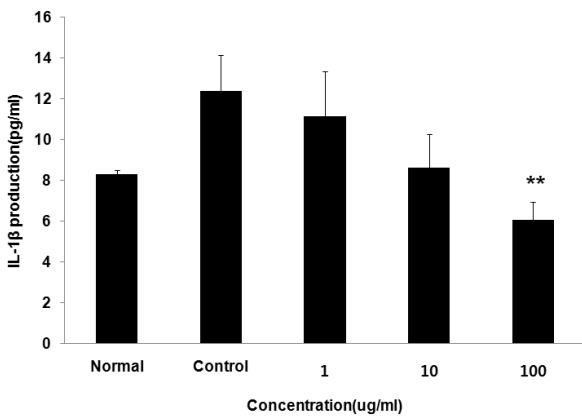


Fig. 5. Effects of GK extract on LPS-stimulated IL-1 β production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GK for 24 hours. The results were presented by the mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by T test (** $p < 0.01$).

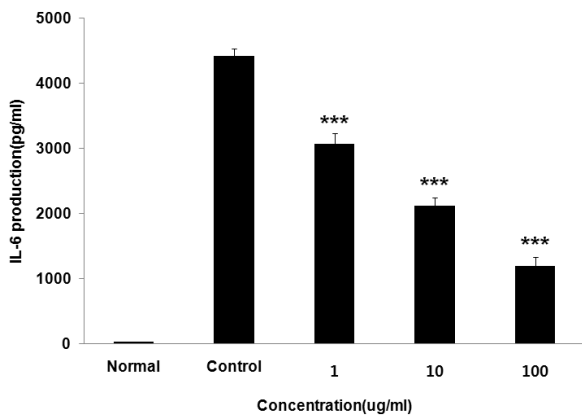


Fig. 6. Effects of GK extract on LPS-stimulated IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GK for 24 hours. The results were presented by the mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by T test (** $p < 0.001$).

여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 11.1 ± 2.2 pg/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 8.6 ± 1.6 pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 6.1 ± 0.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는(** $p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

3) IL-6 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포내 IL-6 생성량을 측정된 결과, 대조군이 4415.7 ± 116.7 pg/ml, 정상군이 31.7 ± 1.2 pg/ml, GK 투여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 3063.5 ± 172.0 pg/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 2114.9 ± 128.8 pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 1198.5 ± 138.1 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는(** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

4) TNF- α 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포내 TNF- α 생성량은 대조군을 5491.1 ± 118.0 pg/ml로 나타냈을 때, 정상군은 2925.2 ± 86.6 pg/ml, GK 투여군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 4201.1 ± 44.5 pg/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 3954.9 ± 79.0 pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 3501.1 ± 222.4 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는(** $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

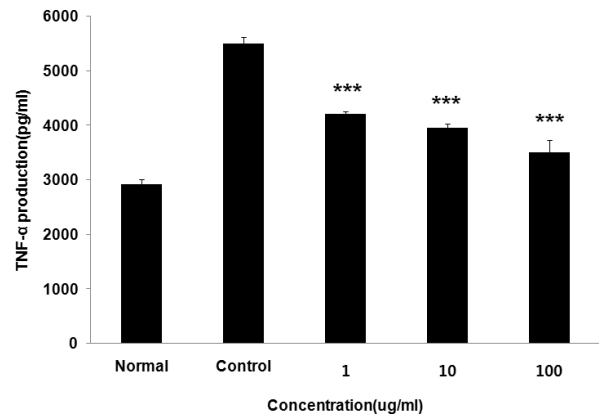


Fig. 7. Effects of GK extract on LPS-stimulated TNF- α production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GK for 24 hours. The results were presented by the mean \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by T test (** $p < 0.001$).

3. 체중부하

체중부하변화를 측정된 결과, 대조군의 측정값을 $100 \pm 13.6\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $142.2 \pm 13.2\%$, 양성대조군인 indomethacin 투여군이 $121.3 \pm 12.7\%$, GKHA 투여군은 $117.2 \pm 7.7\%$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(* $p < 0.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 8).

4. 간 기능에 미치는 영향

ALT (alanine transaminase)의 경우 대조군(47.4 ± 5.3 U/l)이 정상군(32.4 ± 3.1 U/l)에 비하여 높았으며, GKHA 투여군(40.9 ± 2.4 U/l)은 대조군에 비해 14% 감소를 나타내었다(Fig. 2). AST (aspartate transaminase)의 경우 대조군(137.7 ± 8.6 U/l)이 정상군(64.9 ± 7.8 U/l)에 비하여 높았으며, GKHA 투여군(112.1 ± 7.4 U/l)은 대조군에 비해 19% 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

5. 신장 기능에 미치는 영향

1) Creatinine에 미치는 영향

혈청 중의 creatinine 농도를 측정된 결과 정상군은 0.53 ± 0.01 mg/dl, 대조군은 0.61 ± 0.03 mg/dl, GKHA

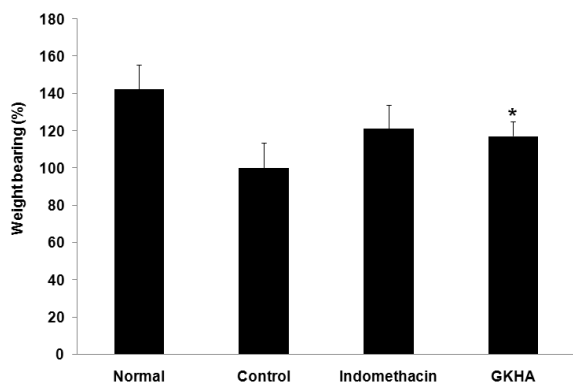


Fig. 8. Effects of GKHA on weight changes in the hind legs of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (* $p < 0.05$). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

투여군은 0.54 ± 0.03 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 12% 감소를 나타내었다(Fig. 10).

2) BUN에 미치는 영향

혈청 중의 BUN 농도를 측정된 결과, 정상군은 13.4 ± 2.0 mg/dl, 대조군은 21.3 ± 3.0 mg/dl, GKHA 투여군은 18.3 ± 2.0 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 14% 감소를 나타내었다(Fig. 11).

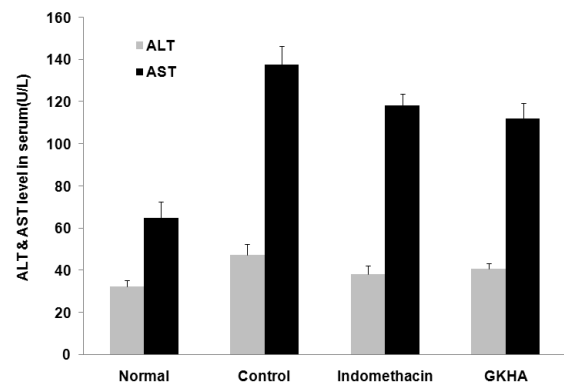


Fig. 9. Effect of GKHA extract on the ALT and AST in MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

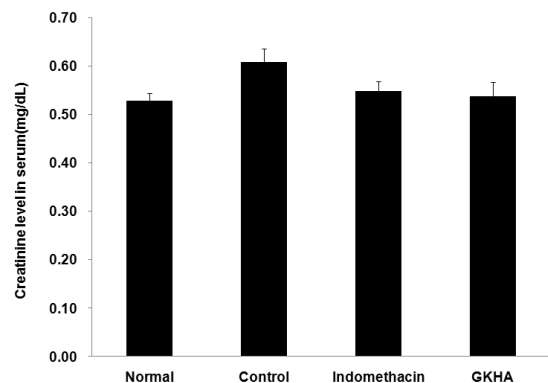


Fig. 10. Effect of GKHA extract on the creatinine in MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

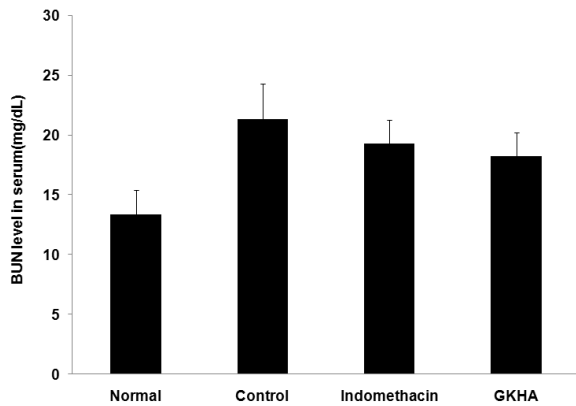


Fig. 11. Effect of GKHA extract on the BUN in MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

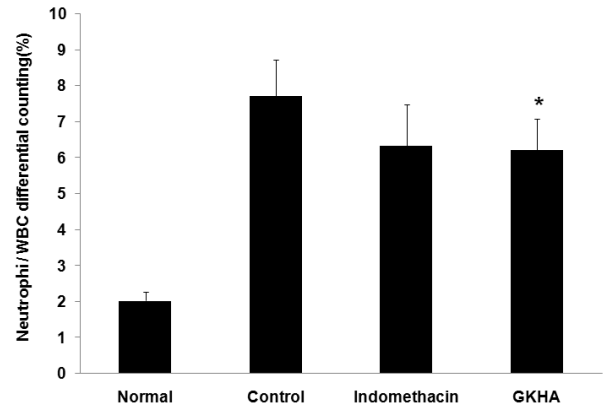


Fig. 13. Effects of GKHA on levels of neutrophil in the blood of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

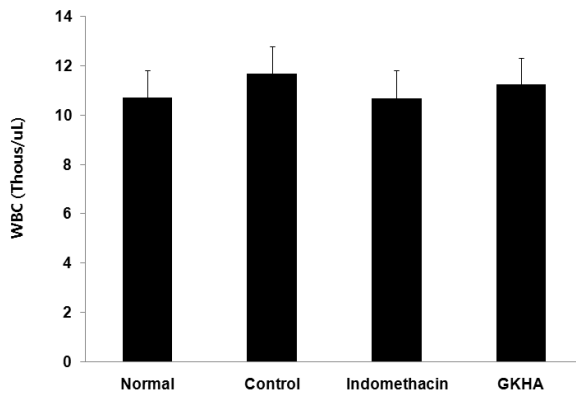


Fig. 12. Effects of GKHA on levels of WBC in the blood of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

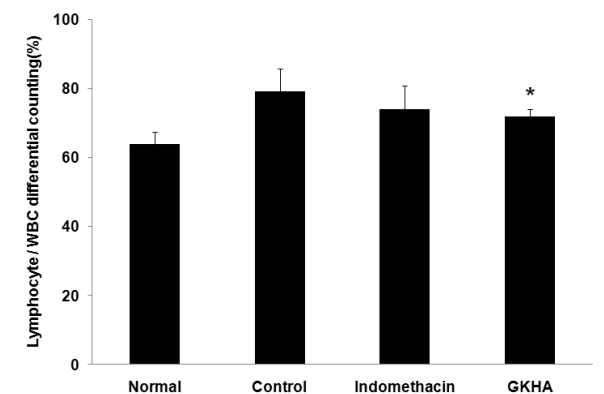


Fig. 14. Effects of GKHA on levels of Lymphocyte in the blood of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

6. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

1) 총 백혈구 생성량에 미치는 영향

혈액 내의 총 백혈구 생성량은 대조군의 생성량이 11.67 ± 1.11 Thous/ μ l로 나타났을 때, 양성대조군인 indomethacin 투여군이 10.66 ± 1.14 Thous/ μ l, GKHA 투

여군이 11.22 ± 1.10 Thous/ μ l로 나타났다(Fig. 12).

2) 호중구 생성량에 미치는 영향

혈액 내 백혈구에 대한 호중구의 비율은 대조군이 $7.70 \pm 1.01\%$ 로 나타났을 때, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 $6.31 \pm 1.16\%$, GKHA 투여군이 $6.22 \pm 0.86\%$ 로

나타나 대조군에 비해 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 13).

3) 림프구 생성량에 미치는 영향

혈액 내 백혈구에 대한 림프구의 비율은 대조군이 79.17±6.63%로 나타냈을 때, 양성대조군인 indomethacin 투여군이 73.87±7.02%, GKHA 투여군이 71.88±2.20%로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 14).

4) 단핵구 생성량에 미치는 영향

혈액 내 백혈구에 대한 단핵구의 비율은 대조군이 5.59±0.56%로 나타냈을 때, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 3.90±0.84%, GKHA 투여군이 4.13±0.67%로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 15).

7. 염증 사이토카인 및 관련인자에 미치는 영향

1) NO 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 NO 생성량을 측정된 결과 정상군은 9.7±2.8 μM, 대조군은 13.3±4.1 μM, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 7.2±1.9 μM, GKHA 투여군은 5.8±2.4

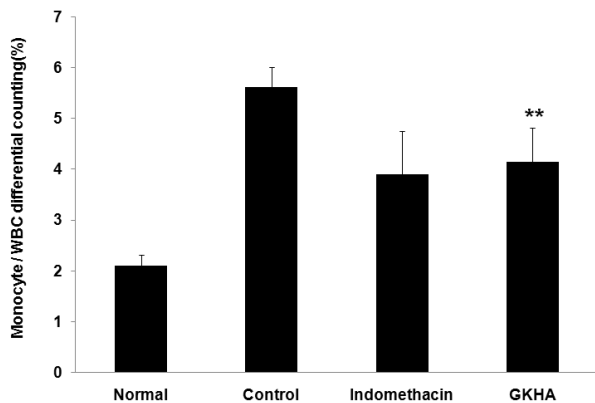


Fig. 15. Effects of GKHA on levels of Monocyte in the blood of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

μM으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 16).

2) PGE2 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 PGE2 생성량을 측정된 결과 정상군은 1,600.3±186.6 pg/ml, 대조군은 2568.2±290.1 pg/ml, 양

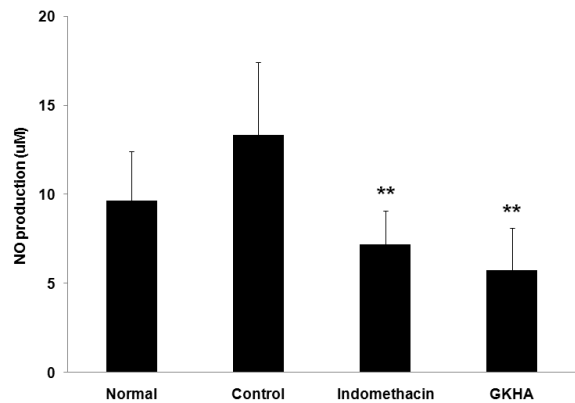


Fig. 16. Effects of GKHA on levels of NO in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rats. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

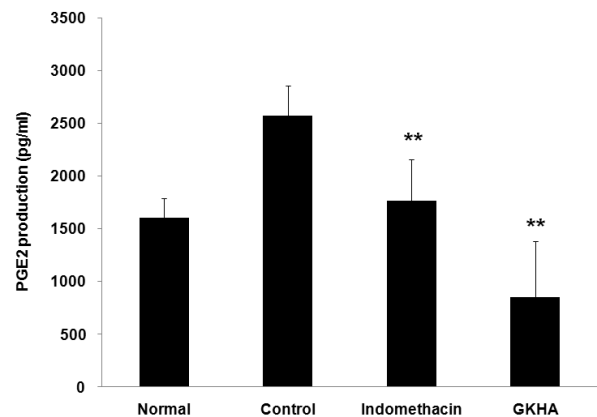


Fig. 17. Effects of MBST on levels of PGE2 in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rats. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

성대조군인 indomethacin 투여군은 1765.6±391.9 pg/ml, GKHA 투여군은 853.5±526.6 pg/ml으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 17).

3) TIMP-1 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 TIMP-1 생성량을 측정한 결과 정상군은 678.9±64.9 pg/ml, 대조군은 766.5±130.8 pg/ml, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 645.2±95.3 pg/ml, GKHA 투여군은 588.8±66.9 pg/ml으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 18).

4) MMP-2 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 MMP-2 생성량을 측정한 결과 정상군은 0.47±0.06 ng/ml, 대조군은 0.57±0.06 ng/ml, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 0.54±0.05 ng/ml, GKHA 투여군은 0.64±0.03 ng/ml으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(**p<0.01) 증가를 나타내었다(Fig. 19).

5) MMP-9 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 MMP-9 생성량을 측정한 결과 정상군은

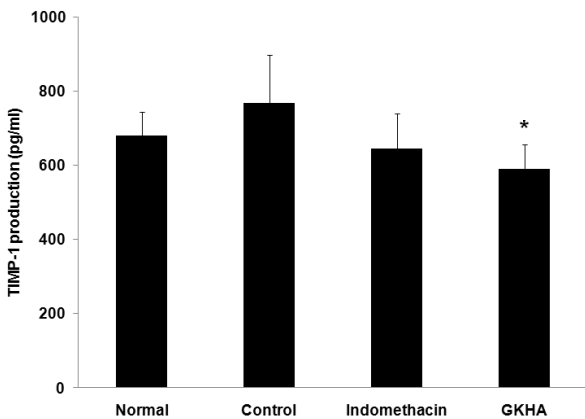


Fig. 18. Effects of GKHA on levels of TIMP-1 in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

0.33±0.06 ng/ml, 대조군은 0.40±0.06 ng/ml, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 0.34±0.05 ng/ml, GKHA 투여군은 0.27±0.05 ng/ml으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 20).

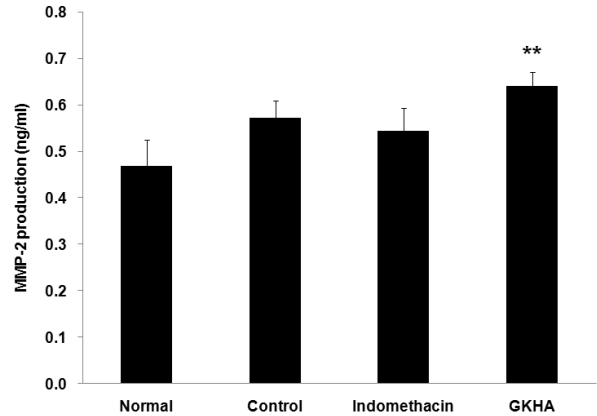


Fig. 19. Effects of GKHA on levels of MMP-2 in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

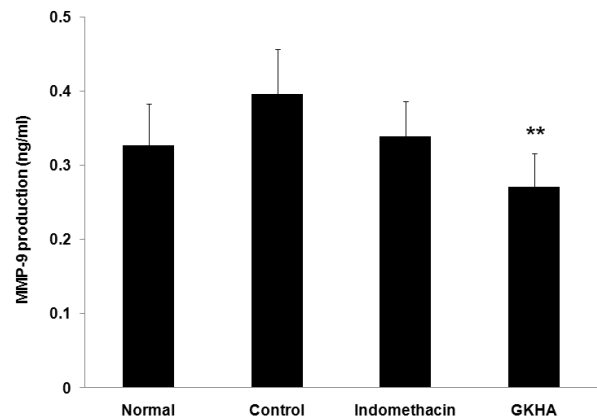


Fig. 20. Effects of GKHA on levels of MMP-9 in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

6) LTB4 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 LTB4 생성량을 측정한 결과 정상군은 463.6±72.3 pg/ml, 대조군은 581.8±65.3 ng/ml, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 501.5±90.6 ng/ml, GKHA 투여군은 293.7±59.7 ng/ml로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(**p<0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 21).

7) hs-CRP 생성량에 미치는 영향

혈청 내의 hs-CRP 생성량을 측정한 결과 정상군은 0.19±0.01 pg/ml, 대조군은 0.20±0.03 pg/ml, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 0.17±0.02 pg/ml, GKHA 투여군은 0.18±0.02 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 22).

8. Cartilage volume에 미치는 영향

무릎관절의 연골 파괴정도를 측정한 결과 정상군을 0.66±0.10 mm³으로 나타냈을 때, 대조군은 0.20±0.08 mm³, 양성대조군인 indomethacin 투여군은 0.43±0.08 mm³, GKHA 투여군은 0.37±0.09 mm³으로 나타나, 대조군에 비해 GKHA 투여군에서 유의성 있는(*p<0.01)

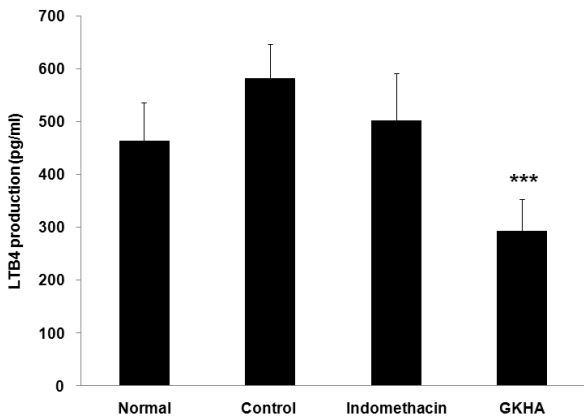


Fig. 21. Effects of GKHA on levels of LTB4 in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rats. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

증가를 나타내었다(Fig. 23, 24).

9. 조직병리학적 변화

Hematoxylin & Eosin 염색 및 Safranin-O 염색 결과, 정상군 관절의 연골조직, 활막조직 및 섬유조직은 정상적으로 위치하고 조직의 변형이 없었다. 대조군은 MIA에 의해 골관절염이 유발되어 연골조직과 활막조직, 섬유조직의 변형이 심하게 일어나 조직 간의 경계가 모호해지며, 연골조직의 손실이 많이 나타났다. GKHA 투여군은 대조군에서 비해 연골조직과 활막조직, 섬유조직의 변형이 많이 억제되고, 연골조직내의 붉은 색으로 염색된 연골세포가 많이 관찰되어 대조군에 비해 연골세포의 파괴가 억제됨이 나타났다(Fig. 25).

고찰»»»»

골관절염은 지속적인 부하로 인해 관절연골과 연골하골 조직의 항상성을 변화시키는 생체역학과 물질대사 요인이 복합적으로 작용하여 국소적으로 퇴행성 변화가 발생하는 만성질환이다¹⁾. 그중 슬관절은 골관절염은 최다 호발 부위로 인식되며 고령에 기인하는 것 외에 내반슬,

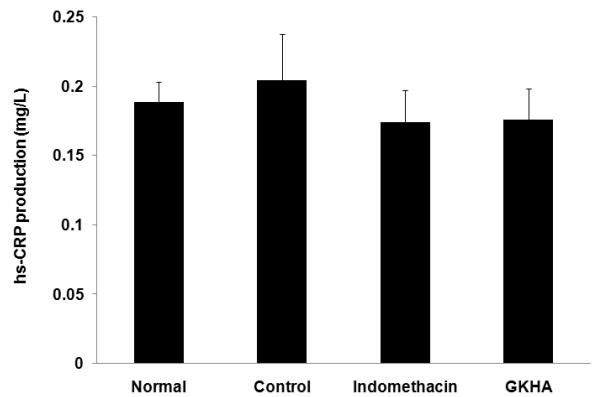


Fig. 22. Effects of GKHA on levels of hs-CRP in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat. The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rats. Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05). Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

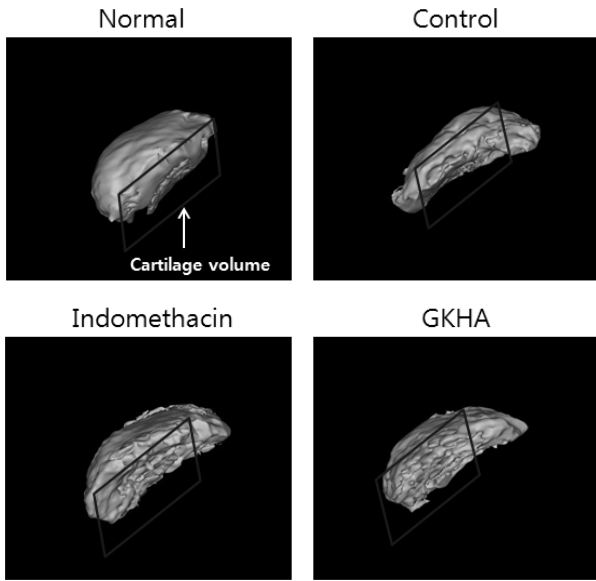


Fig. 23. Effects of GKHA on imaging of cartilage degeneration using Micro-CT arthrography in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats.

외반슬 등 부하 축의 이상 혹은 여러 가지 관절염에 의해서도 발병된다. 병리적으로 연골하 골경화, 골극 형성, 관절연골의 소실, 관절의 변형, 및 활막 염증과 같은 소견을 보이며, 임상적으로 통증, 종창, 피로감, 관절의 운동장애, 운동 시 마찰음을 유발한다²⁶⁾.

골관절염의 발병기전은 아직 불확실하나 최근에는 세 단계의 과정으로 인식된다. 첫 번째 단계는 염증이나 여러 기계적인 자극에 의한 효소반응 및 대사의 변화로 시작되는데 이로 인해 연골기질(cartilage matrix)이 손상된다. 두 번째 단계는 연골세포가 조직 손상이나 변화를 감지하여 이화작용 및 동화작용이 발생한다. 세 번째 단계는 치유와 재형성 과정의 실패로 인한 점진적인 연골세포의 동화작용의 감소 및 관절연골의 소실로 인해 연골세포가 사멸하면서 골관절염이 진행된다^{1,27)}.

서양의학에서 골관절염의 일반적인 치료는 약물치료, 물리요법, 주사요법이 있으며 보존적 치료에 장기간 반응하지 않거나 관절의 변화가 진행되는 경우에는 수술을 시행하기도 한다²⁸⁾. 그러나 hyaluronate, chondroitin sulfate 등을 이용한 주사요법은 아직 효과가 충분히 검증되어 있지 않으며²⁹⁾, 비스테로이드성 소염제는 장기 복용 시 신장 기능의 저하 및 위장관 장애를 유발할 수 있고³⁰⁾, 아세트아미노펜은 단순히 진통효과만 있어 골관절염의 진행

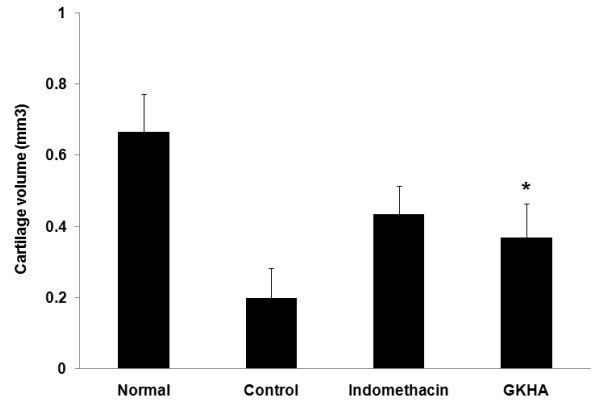


Fig. 24. Effects of GKHA on levels of Cartilage volume in the serum of MIA-induced osteoarthritis Rat.

The results were expressed as mean±S.D. from 8 osteoarthritis Rat. Statistically significant value compared with control by T test (***p<0.001).

Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

에 대한 근본적인 억제제가 어려우며, COX-2 억제제를 장기 복용 시 심장질환 등 순환기계 부작용을 초래할 수 있어, 골관절염에 근본적인 연골의 재생 및 보호를 촉진하는 보다 안전하고 유효한 치료제가 필요한 실정이다^{31,32)}.

한의학에서 골관절염은 風寒濕邪가 인체에 침입하여 발생하는 痺症의 범주에 속하며, 痺症은 歷節風, 白虎歷節風, 痛風 등으로 혼용되어 불리웠다³³⁾. 「黃帝內經」에서는 “痺者痛也”라 하였으며, 張³⁴⁾은 “痺者閉也. 壅閉經絡 血氣不行”이라 하였다. 「黃帝內經 素問·痺論」³⁵⁾에서는 “風寒濕 三氣雜之, 合而爲痺也”라 하여 痺證은 風寒濕에 의하여 발생한다고 하였고 또한 風寒濕 三邪의 偏勝에 따라 行痺, 痛痺, 着痺, 肝心脾肺腎의 五臟痺, 筋脈肌皮骨의 五痺에 대해 언급하고 있다. 「金匱要略」²²⁾과 「傷寒論」³⁶⁾에서 太陽風濕, 濕痺, 歷節病을 언급하여 그 증상으로 “歷節痛 不可屈伸”, “其痛如掣”, “諸肢節疼痛 身體魁 脚腫如脫”하다고 하였다.

痺症의 치료원칙은 正氣가 衰하였을 때 外邪의 침입으로 虛實이 공존하므로 標本緩急과 扶正祛邪를 고려하여 邪氣의 輕重에 따라 清熱, 祛風, 散風, 除濕 하고, 正氣가 虛할때는 주로 虛寒한 경우로 溫補를 위주로 치료한다³⁷⁾.

桂芍知母湯은 「金匱要略」²²⁾에 기재되어 있는 처방으로 “諸肢節疼痛 身體魁 脚腫如脫 短氣 溫溫欲吐 桂枝芍藥 知母湯主之.”라 하여 肢節疼痛에 대한 진통작용이 언급되

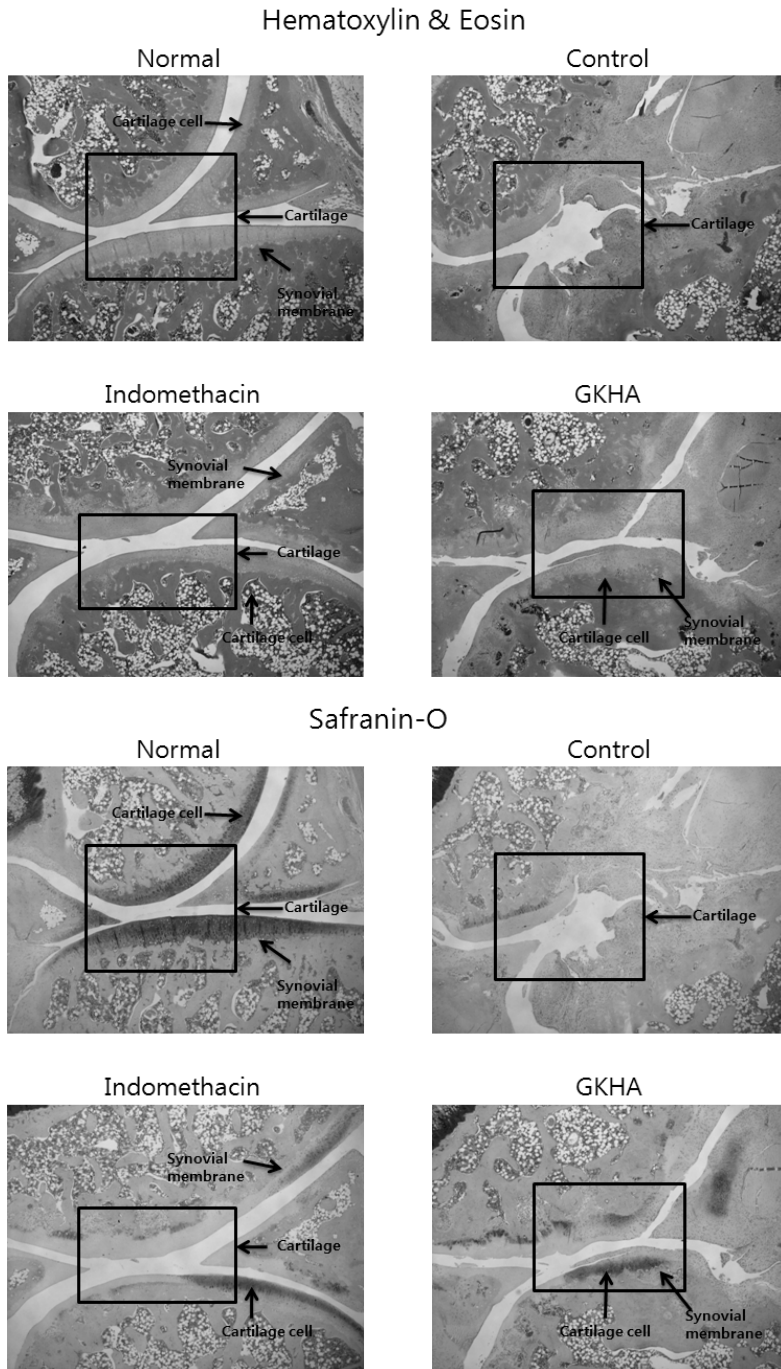


Fig. 25. Effects of GKHA on joint pathology with magnifying power of 25 (Hematoxylin & Eosin staining, Safranin-O staining) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis Rat. Normal: Normal SD-Rat group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, Indomethacin: MIA-induced osteoarthritis group treated with indomethacin, GKHA: MIA-induced osteoarthritis group treated with GKHA.

었으며, 본 연구에서 사용한 加味桂芍知母湯(GK)은 桂芍知母湯에 牛膝과 威靈仙을 가한 처방이다. 牛膝은 散瘀血, 消癰腫, 强筋骨하는 효능이 있어 腰膝痠痛, 四肢拘攣, 痿痺 등을 주치하며²⁵⁾, 이 등³⁸⁾ 및 도 등³⁹⁾은 牛膝 약침의 LPS 유도 염증성 관절염 생쥐의 세포성 면역반응을 억제하는 효과가 있음을 보고하였으며, 김 등⁴⁰⁾은 Carrageenan

으로 유발한 관절염 흰쥐에서의 항염증 효과가 있음을 보고하였다. 威靈仙은 祛風除濕, 通絡止痛의 효능이 있어 風濕痺痛, 肢體麻木, 筋脈拘攣, 屈伸不利 등을 주치하여 또한 性味가 辛散溫通하고 性猛善走하므로 風濕痺痛을 치료하는 要藥이며²⁵⁾, 장 등⁴¹⁾은 lipopolysaccharide 유발 관절염 모델에서 IL-1 β 발현이 억제됨을 보고하였고, 유

등⁴²⁾은 carrageenan 유발 관절염모델에서 부종증가율, CRP, ESR 및 WBC의 감소로 소염, 진통, 및 해열에 유효함을 보고하였다.

痺症을 치료하는 치료혈에는 足三里, 委中, 陽陵泉, 陰陵泉 등으로⁴³⁾, 그 중 委中(BL40)은 足太陽膀胱經의 合穴로써 膀胱經氣의 鬱滯에서 기인한 鬱熱을 제거시키고 表氣를 소통시켜 利腰膝, 舒筋通絡, 祛風濕의 효능이 있으며 腰背痛, 腰背神經痛, 坐骨神經痛, 下肢痛을 치료하여^{44,45)}, 이에 저지는 본 연구의 치료혈로 委中을 선택하였다.

藥鍼療法은 水鍼療法, 穴位注射療法이라고도 불리며 經絡學說의 원리에 따라 有關한 穴位나 압통점 혹은 體表의 觸診을 통한 反應점에 정제된 各種藥物을 주입하여 刺鍼效果와 藥物의 藥理作用을 통하여 生體의 기능을 조절하고 치료효과를 높이는 新鍼療法이다⁴⁶⁾.

桂芍知母湯에 대한 연구는 현재 홍 등²⁴⁾이 MIA로 골관절염이 유도된 백서에 경구투여하여 골관절염의 치료효과를 실험적으로 규명하였으나, 골관절염 치료에 桂芍知母湯을 藥鍼液의 형태로 응용한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저지는 桂芍知母湯이 관절 통증에 유효하다는 문헌적 근거 및 기존 연구에 착안하여, 본 연구에서는 桂芍知母湯에 牛膝, 威靈仙을 加한 加味桂芍知母湯藥鍼液(GKHA)을 이용하여 골관절염에 미치는 치료효과를 규명하고자 하였다. RAW 264.7 세포에서는 항산화 및 항염증 효능을 분석하였고, SD-rat의 무릎 관절강 내에 monosodium iodoacetate (MIA)를 주입하여 골관절염을 유발 후 GKHA를 委中穴에 주입하여 뒷발 체중부하측정, 혈액 내 면역세포, 염증 cytokine 및 인자에 미치는 영향, cartilage volume에 미치는 영향 및 조직병리학적 조건을 관찰하였다.

In vitro 실험을 통해 GK 추출물에서 효능이 있다고 판단되어, 본 처방을 통해 약침액으로 만들기 위하여 추출 방법에 차이를 두어 GKHA 약침액을 in vivo 실험에 사용하였다. 골관절염 유발 물질로 쓰인 MIA는 관절연골 세포의 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성 억제를 통한 변성을 일으켜 골관절염을 유발하며⁴⁷⁾, 용량의 조절을 통하여 골관절염의 정도를 조절 가능 하다고 알려져 있다⁴⁸⁾. MIA 유발 골관절염 동물 모델은 Kalbhen과 Blum에 의해 최초로 연구되었으며 인체의 관절연골에서 동화작용과 이화작용이 평형을 유지

한다는 이론에 근거하여 동화작용 감소시 관절연골의 퇴행화가 유발되리라는 가설을 세우고 연구하였다⁴⁹⁾. MIA 주입 7일째에는 윤활막 및 주위 조직 내의 변형이 발생되며, MMP, collagenase, gelatinase 활성 증가, 연골 및 연골하골의 기질 붕괴, proteoglycan이 소실된다. 또한 골아세포와 파골세포의 활동 증가로 연골하골의 부가가 증가되어⁵⁰⁾, MIA 주입 7일 후부터 GKHA를 주입하였다.

본 연구에서 양성대조군으로 사용된 indomethacin은 1963년에 Winte 등⁵¹⁾이 screening하여 발견한 소염, 진통 작용이 강력한 비스테로이드성 소염진통제로, Cox-1을 억제하여 급성 관절염에 유효하며 백서의 급성 관절염 모델에서 진통 및 항염증 효과가 보고되었다⁵²⁾.

DPPH는 free radical을 함유한 수용성 물질로서 hydroxyl의 질소원자가 항산화 활성을 지닌 물질과의 반응으로 환원시 radical이 소거되어 발생하는 질은 자색의 탈색 정도를 통하여 항산화 효능을 확인하는 방법이다⁵³⁾. ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 소거되어 radical의 본연 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로⁵⁴⁾, DPPH radical 제거능과 유의적인 상관성이 있는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾.

GK의 DPPH 및 ABTS 소거율을 측정된 결과, GK의 농도가 증가함에 따라 소거활성 또한 증가하여 GK의 항산화 효능이 입증되었다(Fig. 1, 2).

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-citrulline으로 변환되는 과정에서 생성되는 두 개의 원자로 구성된 물질로 신경세포의 신호전달로부터, 혈관계의 긴장성 조절, 면역계에서 식균작용까지 다양한 기능을 매개한다^{56,57)}. 반면 TNF- α , IL-1 β 등의 cytokine과 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 물질에 의해 자극을 받으면 염증 반응을 일으킨다⁵⁸⁾. Reactive oxygen species (ROS)는 세균 감염시 살균 작용을 하나, 과다 생산시 신호 전달 분자의 활성화를 통해 세포 사멸을 유도한다⁵⁹⁾. 따라서 NO와 ROS의 활성을 조절 및 억제한다면 염증성 질환 완화에 도움이 되리라 사료된다.

RAW 264.7 세포에서 ROS와 NO 생성량을 측정된 결과, GK의 농도가 증가할수록 ROS 활성도와 NO 생성량이 감소하였으며, ROS 활성 및 NO 생성량은 각각 대조군과 비교시 10, 100 μ g/ml 에서 유의성 있는 감소를

보였다(Fig. 3, 4).

TNF- α , IL-1 β 및 IL-6은 골관절염의 진행에 주요하게 관여하는 cytokine으로, 과다 분비시 MMPs와 aggrecanase 등의 단백분해효소와 prostaglandin의 생성을 촉진시키고, proteoglycan 및 type II collagen의 합성을 방해하여 관절 연골세포와 조직을 손상시킨다^{60,61}.

IL-1 β 는 T세포를 활성화시키고 림프구, 단핵구 등의 세포 염증부위 침윤을 증가시키며 PGE2 및 MMP의 생성과 분비를 촉진시켜 골관절염의 진행을 촉발한다⁶².

IL-6은 B세포의 증식, 분화, 항체 형성에 관여하는 물질로 IL-1 β 와 함께 작용하여 MMPs의 합성을 증가시키고 프로테오글리칸의 생성을 저해하며, TNF- α 와 IL-1에 의해 분비가 촉진되어 파골세포 분화를 유발하여 골흡수와 골 생성을 저해하는 등 골관절염의 활성도와 연관성이 있다⁶³.

TNF- α 는 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 및 matrix metalloproteinases (MMPs) 등의 하위염증 매개물질의 생산을 유발하여 염증을 유발하는 상위 cytokine으로서, 섬유아세포 및 대식세포에 의해 분비되어 prostaglandin 소실증 증가 및 재합성 억제를 통해 골관절염을 진행시킨다⁶⁴.

RAW 264.7 세포에서 항염증 효능을 확인하기 위해 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 를 측정된 결과, IL-1 β 항목에서는 GK 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며(Fig. 5), IL-6 및 TNF- α 항목에서는 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 모두 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 이는 GK가 골관절염의 염증 억제에 효과가 있음을 나타낸다.

체중 부하 검사는 관절염이 유발된 환측 다리의 체중 부하를 측정하는 검사법으로 통증을 감소시키기 위해 취하는 자세의 변화, 활기, 움츠림 등의 행동을 관찰하는 것보다 통증의 객관화에 용이하다⁶⁵. 체중 부하 측정 결과 GKHA 투여군은 대조군과 비교하여 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 8). 이는 골관절염으로 인한 통증으로 인해 체중 부하가 어려웠던 rat가 GKHA 투여로 인해 통증 감소 및 관절기능의 회복을 보여주는 것으로 생각된다.

간 기능을 반영하는 혈청 내 AST와 ALT 농도, 사구체 여과율을 반영하는 혈청 creatine 농도와 신장 기능을 반영하는 BUN 모두 대조군에 비해 감소하여 GKHA 투여시 간과 신장의 기능에 영향을 미치지 않았다(Fig. 9~11).

백혈구는 면역 및 염증 반응의 주요 세포 성분으로 크

게 과립구와 단구, 림프구의 3가지로 나뉘며, 과립구는 다시 호중구, 호산구, 호염기구의 3가지로 나뉘는데, 각각의 생리기능이 있으므로 수의 증감 뿐만 아니라 그 분화를 분류검사하는 것이 중요하다. 호중구는 다형핵백혈구의 하나로 유주성, 탐식능, 살균능 등의 기능을 가지고 있으며, 보통 급성 염증에서 특징적으로 출현하나 만성 염증에서도 상당수가 침윤하며, 만성 염증에서는 단핵구의 침윤이 가장 특징적이다. 또한 림프구는 기능적으로 T 림프구와 B 림프구로 구별되며 면역반응을 가장 특징으로 한다⁶⁶.

GKHA 투여군의 총 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량은 대조군에 비해 모두 감소하였으며, 그 중 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량은 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 13~15).

Prostaglandin E2 (PGE2)는 TNF- α 와 IL-1 β 에 의해 생산이 촉진되며 COX 활성화에 따른 염증 반응의 중요 매개물질로서, 골관절염에서 연골세포의 콜라겐 생산을 저해하고 MMPs의 생산을 증가시켜서 염증 시 주변 조직의 파괴를 유도한다⁶⁷. MMP는 연골세포, 활액, 활막세포 등에서부터 나와서 염증성 관절에서 염증세포 침윤과 섬유화, 골 파괴를 이끄는 단백 분해 효소로서, 골관절염에서 proteoglycan의 분해와의 연관성으로 인해 MMP 활성의 조절이 골관절염 치료에서 중요하다⁶⁸.

TIMP는 MMP의 분비를 제어하고 활성도를 조절하는 내재성 억제제로 교원질 및 단백 다당과 같은 세포외 기질성분을 분해하여 염증성 질환에서는 TIMP와 MMP의 불균형으로 인해 염증 세포와 암종의 침윤 및 전이가 유발되는데⁶⁹, 골관절염 기전에 대한 연구들에서 관절 결체 조직의 변성은 기질 구성 단백질들의 병적 변성에 의해 발생하므로 MMP와 TIMP의 발현 증가를 보인다⁷⁰. 그 중 TIMP-1은 많은 MMP의 활성부위에 결합하여 MMP의 활성을 거의 비가역적으로 저해하며, MMP-2와 MMP-9는 gelatinase로서 제 5,9,10형 콜라겐을 분해한다⁷¹.

LTB4는 lipoxygenase의 활성화로 생성되는 물질로서 급성염증 상태에서 과다 생성시 염증을 악화시키고 골대사에 영향을 미쳐서 류머티스 관절염, 골관절염 등 염증 유발성 골소실 질환에서 생성이 증가되며, LBT4의 생산 억제제 투여가 류머티스 관절염 치료에 유효성이 있다고 보고되었다^{72,73}. CRP는 급성기 반응물질이라 불리는 단백질 중 하나로 염증 질환 및 자가면역질환과 연관된 염

중의 지표로 쓰이며 류머티스 관절염에서 증가하는 경향이 있다. 그 중 hs-CRP는 표준 CRP보다 낮은 농도의 해당 단백질을 보다 정밀하게 검출할 수 있다⁷⁴⁾.

혈청 내 염증 사이토카인 및 인자에 미치는 영향을 확인하고자 NO, PGE2, TIMP-1, MMP-2, MMP-9, LTB4, hs-CRP를 측정된 결과, MMP-2를 제외한 각각의 인자에서 GKHA 투여군이 대조군에 비해 모두 유의성 있는 감소를 보였다. PGE2 및 LTB4 감소는 GKHA 투여로 콜라겐 생산 및 골대사를 증가시켜 염증 반응을 억제시켰을 것으로 사료되며, TIMP-1 감소는 GKHA 투여군에서 기질의 이화작용을 감소시키고 관절 결체 조직의 변성을 억제한 것으로 보인다. MMP-2 증가는 골관절염에서 연골의 재형성을 유도하고, MMP-9 감소는 염증세포의 침윤 방지와 연골 파괴 방지의 의의가 있을 것으로 보이며, CRP의 감소는 염증의 급성기에 GKHA 투여가 항염증 효과로서 골관절염의 진행을 막는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 Micro CT-arthrography를 사용하여 무릎관절의 cartilage volume을 측정하였다. Micro CT-arthrography는 지주골지수를 분석하여 연골하골의 골흡수 변화, 골극 형성, 연골량 등의 골관절염의 요소들을 확인할 수 있다⁷⁵⁾. GKHA 투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있는 연골 손상 감소를 나타내었다. 이는 GKHA가 진통 및 염증 억제 뿐만 아니라 연골 파괴 억제에도 유효한 것을 의미한다(Fig. 23A, B).

무릎 관절의 염증세포 침윤 및 활막세포의 증식 여부를 확인하기 위해 H&E 염색을 시행한 결과, GKHA 투여군은 연골조직, 활막조직의 손실이 많이 일어난 대조군에 비해 연골조직과 활막조직, 섬유조직의 변형이 많이 억제되고 연골세포의 생성이 확인되었다(Fig. 24). 연골조직으로부터 proteoglycan층을 보존하여 연골상태를 관찰하는 Safranin-O 염색을 실시한 결과⁷⁶⁾, 대조군은 붉은 색으로 염색된 연골조직이 거의 소실되었으나, GKHA 투여군은 대조군에 비해 연골조직 내의 붉은 색으로 염색된 proteoglycan 조직이 활막 주변에 많이 관찰되어 연골세포의 파괴가 억제됨이 나타났다(Fig. 24). 이는 GKHA가 염증세포의 침윤을 억제하여 연골 파괴를 억제시킬 뿐만 아니라 연골 세포에 영양을 공급하여 골관절염 예방에도 효과가 있을 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해보면, 加味桂芍知母湯藥鍼(GKHA)은 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 항염증 및 항산화

효능이 있었고, 간 기능, 신 기능 검사에서 안정성을 보여 안전한 약물임을 알 수 있었다. 또한 MIA로 골관절염이 유발된 rat에서는 혈액 내의 염증 매개인자 발현 억제, 연골량의 증가 및 연골의 파괴를 억제하는 등의 효과가 증명되었다. 다만, 본 연구의 결과는 동물 실험에 한정되어 추후 사람을 대상으로 한 연구를 통하여 추가 검증이 필요할 것으로 사료되며, 이번 연구에서는 골관절염 모델의 모집단 수가 적다는 한계점이 있으므로 보완 연구가 필요할 것으로 보인다.

향후 GKHA가 골관절염의 진행 억제뿐만 아니라 예방에도 효과적임을 밝히는 추가 연구들이 의미 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

加味桂芍知母湯藥鍼이 퇴행성관절염 병리인자 및 동물병태 모델에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS 처리된 RAW 264.7 cell에서 항산화 및 항염증에 미치는 영향을 측정하고, MIA로 유발된 골관절염 동물병태 모델을 이용하여 뒷다리 체중부하 측정, 혈청 내 염증 유발 인자 및 연골 손상 정도 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 및 ABTS 소거율은 농도 의존적으로 증가하였다.
2. ROS 및 NO 생성량은 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소하였다.
3. IL-1 β 생성량은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있게 감소하였고, IL-6과 TNF- α 에서는 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 유의성 있게 감소하였다.
4. 뒷다리의 체중 부하량이 유의성 있게 증가하였다.
5. 간기능 및 신기능 검사에서 AST, ALT, BUN, Creatinine은 모두 감소하였다.
6. 총 백혈구 생성량은 감소하였으나 유의성은 없었으며, 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량은 유의성 있게 감소하였다.
7. NO, PGE2, TIMP-1, MMP-9, LTB4 생성량은 유의성 있게 감소하였으며, hs-CRP 생성량은 감소하였으나 유의성은 없었다.
8. Micro CT arthrography에서 연골량이 유의성 있게 증가하였다.

9. H&E 염색에서 연골세포의 생성이 확인되었고, Safranin-O 염색에서 proteoglycan 조직이 활막 주변에 많이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 加味桂芍知母湯藥鍼은 항산화, 항염증 및 진통 효과가 있고, MIA로 유도된 rat의 골관절염에서 염증 cytokine 및 골관절염 진행 인자를 효과적으로 억제하며, 연골파괴를 감소시켜 골관절염의 치료 뿐만 아니라 예방에도 유효하리라 생각된다.

References>>>>

1. The Korean Orthopaedic Association, Orthopaedics. 6th edition, Seoul:Chosin Publishing INC. 2006:253-61.
2. The Society of Korean Medicine Rehabilitation, Korean Rehabilitation Medicine. 3rd rev. ed, Seoul:Kunja Publishing INC. 2011:84.
3. Han TR, Bang MS, Rehabilitation Medicine. 3rd rev. ed, Seoul:Kunja Publishing INC. 2009:905-36.
4. Korea National Health and Nutrition Examination Survey. 2012 Statics of Korean Health Status and Chronic disease. Available from: <http://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/index.do>.
5. Auw Yang KG, Saris DBF, Dhert WJA, Verbout AJ. Osteoarthritis of the knee : current treatment options and future directions. Current Orthopaedics, 2004;18: 311-20.
6. Yang CH, Gastrointestinal Disorders Associated with Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. The DongGuk Journal of Medicine. 2003;10(2):190-9.
7. Han JD, Shin JH, Hwang HC, Kim DY, Jo H, Lim GI, Interaction of Cytokines in Osteolysis. Korean Orthopedic Research Society. 2000;3(2):125-32.
8. Oh JH, Pain Relieving Effects of the Acupuncture and Electroacupuncture on the Arthritic Model of the Rat. Department of Korean Medicine, Graduate School, Yonsei University. 2003.
9. Oh CG, Analgesic Effect of Electroacupuncture on a Rat Model of CFA(Complete Freund's Adjuvant)-induced Arthritis. Department of Korean Medicine, Graduate School, Wonkwang University. 2001.
10. Kim HY, Choi JB, Effects of Bee Venom and Cervi Cornu Parvum Pharmacopuncture in Monosodium Iodoacetate(MIA)-Induced Osteoarthritis Rat. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2010;20(1):61-77.
11. Kang MS, Baek SU, Kim KS, Effect of Ulmus Davidiana Planch Herbal Acupuncture Solution on Inhibition of Experimental Bone Resorption in Mouse Calvarial Bone Cells. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine. 2008;25(2):119-27.
12. Kim SJ, Effects of Hominis Placenta Herbal-acupuncture and Cervi Pantotrichum Cornu Herbal-acupuncture in MIA-Induced degenerative arthritis and chondrocyte. Department of Korean Medicine, Graduate School, Dongshin University. 2008.
13. Park. DS, Jung SH, Kim SJ, Seo IB, Effects of Bee-venom Treatment on the Expression of NOS, C-fos, Serotonin and Substance P in Central Nerve System of Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritic Pain Model. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2007;17(3): 1-18.
14. Kim YM, Kim SJ, Seo IB, Effects of Bee-venom Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. Journal of Oriental Physiology and Pathology. 2007;21(5):1154-62.
15. Baek YH, Park DS, Effect of Aralia Cordata Pharmacopuncture on Cartilage Protection and Apoptosis Inhibition In Vitro and in Collagenase-induced Arthritis Rabbit Model. Journal of Korean Medicine. 2007;28(4):114-23.
16. Gong. S.E., Oh, M.S., Effects of Sayeok-tang on Papain-Induced Osteoarthritis in Mice. Journal of Oriental Physiology and Pathology. 2013;27(2):212-24.
17. Sung YS, Choi HJ, Oh JM, Ji JG, Park JW, Kim DH, The Effect of KKBT in Papain-Induced Osteoarthritis Mice Models. Journal of Daejeon University Korean Medicine Research center. 2012;21(1):33-52.
18. Lee JM, Hong SY, Oh MS, Effects of Jakyakkamchobujatang on Papain-induced Osteoarthritis in Mice. Journal of Korean Medicine. 2013;34(1):116-35.
19. Park DS, Jung SH, Kim SJ, Seo IB, Effects of Gagamsosokmyeong-tang treatment on the monosodium Iodoacetate-induced mild osteoarthritis in rats. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2011;21(4):49-65.
20. Choi JY, Oh MS, Effects of Kamchobuja-tang on Papain-Induced Osteoarthritis in Mice. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2012;22(4):37-57.
21. Jang HG, Heo DS, Anti-OsteoArthritic effects of Mahwangbujatang on Papain-Induced Osteoarthritic mice model. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2012;22(4):59-77.
22. Zhang ZJ, JinkuiYaolue. Taipei:Tailiangufeng Publishing INC. 1973:32-3.
23. Kim SS, Kim HK, Choi JW, Lee JK, Antiinflammatory, Analgesic and Antihyperuricemic Effects of 'Gyejakjimo-Tang' in Rats. Korean Journal of Pharmacognos. 1995; 26(1):66-73.
24. Hong SM, Oh MS, Effect of Kyejakjimotangkami on Osteoarthritis. Journal of Korean Rehabilitation Medicine. 2013;23(4):39-57.
25. Department of Korean Herbology medicine. Herbology. Seoul:Younglimsa, 2008:305-6,466-7.
26. Yoon JH, Current Clinical Practice: Osteoarthritis Update.

- Korean journal of internal medicine. 2012;82(2):170-4.
27. Lee DY, Moon HS, Jo GH, Chun JE, Effect of Glucosamine for Knee Osteoarthritis. *Knee Surgery and Related Research*. 2001;13(1):130-6.
 28. Yoon MH, Yoon YC, Lee SC, Lee YW, Choi H, Musculoskeletal Disease. Seoul:Kunja Publishing INC. 2003:401.
 29. Kim BH, Hwang CH, Kang ST, Lee WK, Bae JG, Gong YB, Popliteal Artery Occlusion after Total Knee Replacement Arthroplasty. *Knee Surgery and Related Research*. 2007;19(2):257-60.
 30. Lee YJ, Medical treatment of osteoarthritis. *Korean journal of internal medicine*. 2004;67(5):564-7.
 31. Han SH, Pharmacological Treatment of Osteoarthritis. *Injemedical journal*. 2002;23(4):159-66.
 32. Song YJ, Ha CW, The Use of COX-2 Selective Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for the Treatment of Osteoarthritis. *Knee Surgery and Related Research*. 2009;21(2):84-92.
 33. Bae YC, *Jīnshìhuángdīnèijīngsùwèn*. Seoul:Sungbosa. 1994:376-82.
 34. Zhang ZB, *Zhāngshìlèijīng*. Seoul:Sungbosa. 1982:14-20, 815-9.
 35. Wang Q, *Huángdīnèijīngsùwènjīnshì*. Seoul:Euisungdang. 1994:1,60,164,412,206-11.
 36. Cai RZ, *Shānghánlǜnyìquán*. Seoul:Gomunsa. 1984:9-141.
 37. Kim GH, Numbness. Seoul:Jungdam Publishing INC. 1993:23-9.
 38. Lee SD, Kim GS, The effect of *Achyranthis Radix* and *Apitoxin* Aqua-acupuncture on cellular immune responses to LPS-induced arthritis in mice. *The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine*. 2009;16(3):287-315.
 39. Do WS, Kim GH, Kim GS, Effects of Aqua-acupuncture (*Cortex Pumilae*, *Ramulus Cinnamomum*, *Radix Achyranthis*, *Apitoxin*, *Calculus Bovis*, *Fel Ursi*, *Moschus* compound) in Mice with Lipopolysaccharide Induced Arthritis. *The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine*. 2001;18(1):157-69.
 40. Kim YO, Lee SW, Lee SE, Effects of *Achyranthes japonica* on Carrageenan-Induced Arthritis Rat Model. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2009;17(6):470-4.
 41. Jang JH, The Inhibitory Effect of *Phellodendri Cortex* and *Clematidis Radix* Aqua-Acupuncture to IL-1 β in LPS induced Arthritis. *The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine*. 1999;16(1):511-31.
 42. Yu S, Geum DH, Lee MJ, The Inhibitory Effect of *Phello-dendri Cortex* and *Clematidis Radix* Aqua-Acupuncture to IL-1 β in LPS induced Arthritis. *Journal of Korean Rehabilitation Medicine*. 2004;14(2):75-84.
 43. Wang CR, *Yīlíngǎicuò*. Taipei:Tailiangufeng Publishing INC. 1975:65.
 44. Korean Medicine Department of Meridian and Acupoint, Study of Acupuncture and Moxibustion. Seoul:Jipmundang. 1998:440-2,503-5.
 45. Kim GW, Essays of the Traditional Saam Acupuncture Method. Cheonan:Chorakdang. 2007:408-10.
 46. Research Council of Korean Pharmacopuncture Institute, *Pharmacopunctureology*. Seoul:Elsevier Korea. 2011:3-8.
 47. Jo HJ, Jang JB, Jung JW, Sung SC, Kim TK, Prevalence of Radiographic Knee Osteoarthritis in Elderly Koreans. *Knee Surgery and Related Research*. 2009;21:223-31.
 48. Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology and biochemistry. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1670-9.
 49. Kalben DA, Blum U. Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthritis. *Arzneimittelforschung*. 1977;27(3):527-31.
 50. Schuelert N, McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neurosci Lett*. 2009;465:184-8.
 51. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Anti inflammatory and antipyretic activities of indomethacin. *J. Pharmacol. Exptl. Therp*. 1963;141:369.
 52. Kim. NJ, Park JY, Han HC, Jang SH, Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Ibuprofen, Indomethacin and NS-398 on an Acute Model of Arthritis in Rats. *Korean Journal of Anesthesiology*. 2001;40:802-13.
 53. Kim SJ. DPPH radical scavenging and ACE inhibitory effects of the aerial parts of *Fagopyrum esculentum*, and isolation of flavonoids. MS thesis. Sunchon National Univ. 2004.
 54. Kim YU, Yang JW, Lee CH, Kwon EK, ABTS Radical Scavenging and Anti-Tumor Effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (Pine Mushroom). *Journal of Food Science and Nutrition*. 2009;38(5): 555-60.
 55. Lee YM, BaeJH, JungHY, KimJH, Park DS, Antioxidant Activity in Water and Methanol Extracts from Korean Edible Wild Plants. *Journal of Food Science and Nutrition*. 2011;40(1):29-36.
 56. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(17):7797-801.
 57. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-42.
 58. Brune, B., J. Zhou, and A. Von Knethen. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl*. 2003; 84:4-22.
 59. Bedard K, Krausea KH. The NOX family of ROS-generat-

- ing NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2007;87(1):245-313.
60. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Bruce 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.
 61. Gallo J, Mrazek F, Petrek M. Variation in cytokine genes can contribute to severity of acetabular osteolysis and risk for revision in patients with ABG 1 total hip arthroplasty: a genetic association study. *BMC Med Genet*. 2009;10(109):1-11.
 62. Mori, I, et al. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol*. 1996;157:3178-82.
 63. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002;39(1-2):237-46.
 64. Feldmann M, Pusey CD. Is there a role for TNF- α in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1243-52.
 65. Lee YS. Behavioral and histological changes of Monosodium iodoacetate (MIA) induced osteoarthritis in rats. Department of Korean Medicine, Graduate School, Korea University. 2008.
 66. Lee GN, Kwon OH, clinical pathology File. 3rd edition, Seoul: Medicine Culture Publishing INC. 2003:95,102,334, 718-20,754,1075,1080,1173,1192,1198,1227.
 67. Martel-Pelletier J, JP Pelletier, H Fahmi. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues *Semin Arthritis Rheum*. 2003;33(3):155-67.
 68. Halliwell, B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity. *Oral Dis*. 2000;6:137.
 69. 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.
 70. No GC. Expression of the Matrix Metalloproteinase-1, 2, 3, 9, 13 and TIMP-1 in Degenerative Osteoarthritis. Department of Korean Medicine, Graduate School, Korea University. 2007.
 71. Gupta K, Shukla M, Cowland JB, Malemud CJ, Haqqi TM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(10):3326-35.
 72. Lee HJ, Ryu JH. Screening of Leukotriene B₄ Receptor Antagonist Activity from the Herbal Drugs. *Natural Product Sciences*. 2000;31(3):273-9.
 73. Griffiths RJ, Smith M, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, Scamporrì DN, Eskra JD, Byrum RS, Koller BH, McNeish JD. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J Exp Med*. 1997;185:1123-9.
 74. Yeo HJ, Lee JH, Lee HJ, Byun KS, Im HJ, Kim MJ. Microvascular Findings in Patients with Rheumatoid Arthritis-Assessed, Using Fundus Photography and Fluorescein Angiography. *J Rheum Dis*. 2013;20(4):231-7.
 75. 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.
 76. 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.