眞武湯이 MIA 유도 골관절염 흰쥐 모델에 미치는 영향

양두화 · 우창훈 · 안희덕

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과

Effects of *Jinmu-tang* on the Osteoarthritis by MIA in Rats

Doo-Hwa Yang, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D., Hee-Duk An, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives The object of this study was to investigate the antioxidative and antiinflammatory effects of *Jinmu-tang* extract (JMT) on the Monosodium iodoacetate (MIA)-induced rat osteoarthritis.

Methods To investigate the antioxidant capacities of JMT, we measured the total polyphenol and flavonoid, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity. To evaluate the antioxidative and antiinflammatory effects of JMT, the rats were divided into 5 groups (n=8). Normal group was not induced by MIA and treated at all (N), control group was induced by MIA and not treated at all (Con), positive control group was induced by MIA and orally administered indomethacin 5 mg/kg (Indo) and experimental groups were induced by MIA and orally administered JMT 100 mg/kg (JMT100) and JMT 200 mg/kg (JMT200) for 4 weeks. The changes of anti-type II collagen antibody in serum, heme oxygenase-1 (HO-1), phosphorylated inhibitor of κ B α (p-I κ B α), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in knee joint tissue and histopathological observation (Hematoxylin & Eosin and Safranin-O stain) were measured.

Results Total polyphenol and flavonoid levels of JMT were 26.90 ± 0.33 mg/g and 6.02 ± 0.34 mg/g. IC₅₀ of L-ascorbic acid and JMT of DPPH radical scavenging activity were 1.35 ± 0.07 μ g/ml and 52.95 ± 0.97 μ g/ml. IC₅₀ of L-ascorbic acid and JMT of ABTS radical scavenging activity were 3.18 ± 0.02 μ g/ml and 91.49 ± 1.74 μ g/ml. In serum, the anti-type II collagen antibody levels of JMT100 and JMT200 groups were decreased significantly. In knee joint tissue, the HO-1 level of JMT200 was increased significantly. The p-I κ B α and TNF- α levels of JMT200 were decreased significantly. The COX-2 and iNOS levels of JMT groups were decreased significantly. In histopathological observation, in comparison with Con, synovial tissue, cartilage and proteoglycan of JMT100 and JMT200 were well preserved.

Conclusions According to the results, It is considered that JMT has antioxidant and anti-inflammatory effects for MIA-induced rat osteoarthritis, so it could be applied to osteoarthritis treatment. (**J Korean Med Rehabil 2018;28(1):19-31**)

RECEIVED December 29, 2017

REVISED January 16, 2018

ACCEPTED January 17, 2018

CORRESPONDING TO

Hee-Duk An, Department of
Rehabilitation Medicine of Korean
Medicine, College of Korean Medicine,
Daegu Hanny University, 136
Sincheondong-ro, Suseong-gu,
Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2109

FAX (053) 770-2055

E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2018 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Jinmu-tang*, Osteoarthritis, Monosodium iodoacetate (MIA), Antiinflammation, Antioxidation

서론»»»»

골관절염은 연골의 손상, 연골하 골의 비대, 골연골부의 골극 형성, 퇴행성 변화, 관절의 변형을 특징으로 하는 성인에게 가장 흔한 관절 질환으로, 체중을 받는 척추, 무릎, 고관절 뿐만 아니라 손, 발에도 발생하여 관절통, 강직감, 부종 등이 주로 나타나며, 관절의 염발음이나 근육경련이 동반되기도 한다¹⁾.

골관절염에 대한 유병률은 고령일수록 높아지는데²⁾, 현재 우리나라는 고령화 사회를 지나 고령 사회로 향해감에 따라³⁾ 골관절염에 대한 이환률은 점차 높아질 것으로 예상된다. 또한, 골관절염에 이환된 사람은 신체적 문제 뿐만 아니라 정신적 문제도 발생될 수 있으며, 골관절염에 이환되지 않은 사람보다 건강과 관련된 삶의 질이 낮기 때문에 골관절염의 치료에 대한 지속적인 연구가 필요하다^{4,5)}.

眞武湯은 張仲景의 《傷寒論》⁶⁾에서 처음 언급된 처방으로, 腎陽의 虛衰로 水氣가 內停되어 나타나는 증상을 치료하는 처방이며, 溫陽利水하는 효능이 있다. 腎의 기능이 虛寒하게 되면 化氣行水하지 못하고, 四肢를 溫陽하지 못하여 虛冷하게 되는 것을 치료하는 처방이다⁷⁾.

眞武湯의 C6 Glial 세포사⁸⁾, 감상선기능저하증⁹⁾, 신독성¹⁰⁾, 배양 인체 폐산지움 세포증식과 기질침착¹¹⁾에 관한 실험적 연구가 선행되었으나, 골관절염에 관한 연구는 없었으며, 眞武湯의 구성 약재인 白朮¹²⁾, 白芍藥¹³⁾, 附子¹⁴⁾, 白茯苓^{15,16)}, 生薑¹⁷⁾은 염증에 대한 억제, 항산화, 진통 작용을 가지고 있기 때문에, 眞武湯 또한 이와 같은 작용을 가지고 있을 것이라 생각된다.

이에 저자는 眞武湯의 항산화능 관련 지표를 측정 한 후, 흰쥐의 무릎 관절에 monosodium iodoacetate (MIA)로 골관절염을 유발하였으며, 4주간 眞武湯 추출물을 투여한 후 혈청 내 anti-type II collagen antibody, 관절 조직 내 항산화 단백질, 염증 cytokine과 매개인자를 측정하였으며, 관절 연골의 조직병리학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법»»»»

1. 재료

1) 동물

실험에 사용된 동물은 대한바이오(Gyeonggi-do, Korea)에서 6주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (170~200 g)을 공급받아, 고형 사료(Samyang corporation, Korea)와 물을 실험 당일까지 충분히 공급하였고, 사육실은 온도($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) 및 습도($55\pm 5\%$)가 조절되어 12시간 light-dark cycle을 유지하도록 하여 1주간 적응 과정을 거친 후 실험을 시작하였다.

동물실험에 대한 과학적, 윤리적 타당성을 검토하고, 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인(승인번호: DHU2016-042)을 받았다.

2) 시료

시료를 만들기 위해 사용된 眞武湯의 약재들은 《東醫寶鑑》¹⁸⁾에 의거하여 웅기한약(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 1첩 분량은 다음과 같다(Table I).

眞武湯 약재 500 g 분량에 증류수 5 l를 넣어 열탕 추출기에서 2시간동안 추출하여 얻은 추출액을 감압 증류장치를 이용하여 농축한 후 동결 건조기를 사용하여 완전 건조한 眞武湯 추출물(JMT 43.6 g) 분말을 얻었다. JMT 분말은 실험에 사용하기 전까지 -80°C 에 보관하여 사용하였다.

3) 시약

실험에 사용된 MIA, dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), gallic acid, folin-ciocalteu's

Table I. The Composition of Jinmu-tang

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (g)
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	12
(炮)附子	<i>Aconiti Lateralis Preparata Radix</i>	12
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	6
Total amount		50

phenol reagent, potassium persulfate, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), diethylene glycol, naringin는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 indomethacin는 SK chemical (Gyeonggido, Korea)에서 구입하였다. Sodium carbonate는 Daejung (Gyeonggido, Korea)에서 구입하였으며 L-(+)-Ascorbic acid는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다. Heme oxygenase-1 (HO-1), phosphorylated inhibitor of $\kappa B \alpha$ (p-I $\kappa B \alpha$), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), β -actin과 2차 항체, histone은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dimethyl sulfoxide는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents와 nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위하여 BCA protein assay kit를 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4) 실험기기

실험에 사용된 열탕추출기(DWT-1800T, Daewoong Co., Korea), 동결건조기(FD5508, Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), 감압 증류기(Buchi B-480, Switzerland), 냉장고속원심분리기(Mega17R, Korea), vortex mixer, 전자저울(CAS, Korea), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) Total polyphenol 함량 측정

Folin-ciocalteu 방법으로 측정하였다¹⁹⁾. 시료 20 μ l에 증류수 1.58 ml를 가한 후, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ l를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨다. 그 후 20% sodium carbonate 300 μ l를 더하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도(Multiscan spectrum, Thermo Scientific, MA, USA)를 측정하였다. Total

polyphenol 함량은 표준물질로 gallic acid를 사용하여 이와 같은 방법으로 측정한 후 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

2) Total flavonoid 함량 측정

Lister 방법에 따라 측정하였다²⁰⁾. 시료 100 μ l에 diethylene glycol 1 ml를 잘 섞어준 후, 이 혼합물에 1 N NaOH 100 μ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total flavonoid 함량은 naringin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

3) DPPH radical 소거능 측정

각 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l와 60 μ M DPPH 용액 100 μ l를 혼합하여 실온에서 30분간 암소 상태에서 반응시켜²¹⁾, 540 nm에서 흡광도를 사용하여 측정하였다. 전자공여능은 아래의 공식[1]에 따라 계산하여 산출하였으며, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

EQUATION [1]:

$$\text{DPPH Radical scavenging activity (\%)} \\ = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않았을 때의 흡광도, OD_{sample}: 시료가 들어갔을 때의 흡광도.

4) ABTS radical 소거능 측정

2.4 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS 용액을 혼합한 후 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치한다²²⁾. 이 반응액을 734 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 가 되게 absolute ethanol로 희석하였다. 시료 5 μ l을 ABTS 95 μ l에 첨가 후 15분 반응하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 아래의 공식[2]에 따라 계산하여 산출하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

EQUATION [2]:

$$\text{ABTS Radical scavenging activity (\%)} \\ = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않았을 때의 흡광도, OD_{sample}: 시료가 들어갔을 때의 흡광도.

5) 군 분리 및 약물투여

실험군은 총 5군으로, 골관절염을 유발하지 않고 아무런 처치를 하지 않은 군(N), MIA로 골관절염 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 군(Con), MIA로 골관절염 유발 후 indomethacin 5 mg/kg을 투여한 군(Indo), MIA로 골관절염 유발 후 JMT 100 mg/kg을 투여한 군(JMT100), MIA로 골관절염 유발 후 JMT 200 mg/kg을 투여한 군(JMT200)이며, 흰쥐를 각각 8마리씩 배정하였다. 약물은 4주간 매일 경구 투여하였다.

6) 흰쥐의 MIA에 의한 골관절염 유발

흰쥐의 오른쪽 무릎 주변을 깨끗이 세척하여 골관절염 유발물질인 MIA를 0.3 ml insulin 주사기(BD 31 G Ultra-Fine II, USA)를 사용하여 오른쪽 무릎의 관절강 내에 80 μ l (120 mg/ml) 씩 투여하였다. MIA 희석은 0.9% saline을 사용하였다.

7) 체중과 식이섭취량 측정

실험동물의 체중 및 식이섭취량은 실험 시작일부터 1회/2일, 동일 시간 동일 조건에서 측정하였다. 체중은 전자체중계로 측정하였고, 실험 종료일 체중과 실험 시작일 체중의 차이를 계산하여 체중증가량(body weight gain)을 구하였다. 식이섭취량은 2일간 제공된 사료에서 2일 동안 섭취하고 남은 사료량의 차이를 계산하여 각 실험군의 하루 사료섭취량을 구하였다.

8) 혈청 내 anti-type II collagen antibody 측정

혈청 내 anti-type II collagen antibody는 실험시작 4주 후 rat anti-type II collagen IgG ELISA kit (Chondrex Inc., Redmond, USA)를 이용하여 측정하였다.

9) Western blot 분석

관절의 조직 내에 있는 세포질을 얻기 위하여 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM CaCl_2 , 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M sucrose, 2 mM MgCl_2 , 0.1 M DTT 그리고 buffer A에 protease inhibitor cocktail을 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄하여 10% NP-40 용액을 첨가한 후, 아이스 위에 20분간 정치시키고 2분간 12,000 rpm으로 원심분리 하여 세포질을 포함한 상층액을

분리하였다. 핵을 얻기 위하여 10% NP-40이 첨가된 buffer A를 2회 행구고 100 μ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA와 10% glycerol)를 첨가하여 재부유 시킨 후 10분마다 vortex를 3회 시행하였고, 4°C에서 10분간 12,000 rpm으로 원심 분리 후 핵이 포함된 상층액을 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 관절 조직에서 세포핵의 histone 단백질과 세포질의 HO-1, p-I κ B α , COX-2, iNOS, TNF- α , β -actin 발현을 측정하기 위해 10 μ g protein을 8~15% SDS-polyacrylamide gel과 전기연동하여 nitrocellulose membrane으로 acrylamide gel을 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 후 PBS-T로 6분마다 5회 세척하였고, 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(PBS-T를 사용하여 1:3000으로 희석)를 상온에서 1시간 반응시켜 PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 ECL 용액에 노출시켜 Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시킨 후 단백질 발현을 확인하여 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량하였다.

10) 조직병리학적 분석

실험 종료 후 10% EDTA가 첨가된 10% formalin 용액에 슬관절을 절단하여 넣고 decalcification 후 Radiographic technique으로 확인한다. Paraffin wax에 decalcification된 슬관절을 넣고 고정한 후 7 μ m의 크기로 coronal section한 조직을 H&E 및 Safranin-O stain을 실시하여 상태를 관찰하였다. 활막 세포의 상태, 염증 반응의 발생 유무 및 염증으로 인한 조직 침윤 여부는 H&E stain에서, 연골 조직의 손상 여부는 proteoglycan을 염색하는 Safranin-O stain에서 확인할 수 있다.

11) 통계분석

In vitro 실험은 평균과 표준오차로 표시하였으며, *in vivo* 실험은 평균과 표준편차로 표시하였다. SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였으며, least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시한 후 각 군 간의 유의성을 측정하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과»»»»

1. Total polyphenol과 total flavonoid 함량

JMT에 함유된 total polyphenol과 total flavonoid를 측정한 결과, 각각 26.90 ± 0.33 mg/g과 6.02 ± 0.34 mg/g의 함량을 보였다(Table II).

2. DPPH 및 ABTS radical 소거능

양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical 소거능 결과, L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 1.35 ± 0.07 μ g/ml을 나타냈으며 JMT는 52.95 ± 0.97 μ g/ml의 값을

나타냈다. ABTS radical 소거능 결과, L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 3.18 ± 0.02 μ g/ml을 나타냈으며 JMT는 91.49 ± 1.74 μ g/ml의 값을 나타냈다(Table III).

3. 체중 및 식이섭취량

MIA 유발 후 4주 동안 모든 군에서 체중이 증가하였으며, body weight gain에서 Con에 비하여 JMT200은 유의성 있는 감소를 보였다(Table IV).

식이섭취는 N 24.0 ± 1.1 g, Con 23.4 ± 0.9 g, Indo 24.0 ± 1.0 g, JMT100 24.1 ± 2.5 g, JMT200 22.5 ± 1.0 g의 결과를 보였으며, JMT200은 다른 군들에 비하여 적은 섭취량을 보였다(Table IV).

Table II. The Contents of Total Polyphenol and Flavonoid of JMT

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
JMT	$26.90 \pm 0.33^*$	$6.02 \pm 0.34^*$

*All values are mean $\pm$ SE of three replications.
JMT: *Jinmu-tang* extract.

Table III. DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity of JMT

Sample	DPPH radical scavenging activity (IC_{50} , μ g/ml)	ABTS radical scavenging activity (IC_{50} , μ g/ml)
L-ascorbic acid	$1.35 \pm 0.07^*$	$3.18 \pm 0.02^*$
JMT	$52.95 \pm 0.97^*$	$91.49 \pm 1.74^*$

*All values are mean $\pm$ SE of three replications.
JMT: *Jinmu-tang* extract, IC_{50} : The half maximal inhibitory concentration.

Table V. Serum Level of Anti-Type II Collagen Antibody

Group	Collagen-II IgG antibody (Unit/ml)
N	-0.06 ± 0.42^b
Con	1.52 ± 0.72^a
Indo	0 ± 0.61^b
JMT100	0.22 ± 0.64^b
JMT200	-0.09 ± 0.4^b

All values are mean $\pm$ SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

Table IV. The Change of Body Weight and Food Intake

Group	Body weight			Food intake (g/day)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g)	
N	264.5 ± 6.9^b	383.3 ± 20.1^a	118.8 ± 14.4^a	24.0 ± 1.1^a
Con	284.4 ± 12.8^a	388.2 ± 22.4^a	103.8 ± 14.3^{ac}	23.4 ± 0.9^{ab}
Indo	284.9 ± 8.4^a	380.9 ± 17.9^a	$96 \pm 12.4b^c$	24.0 ± 1.0^a
JMT100	284.6 ± 11.8^a	381.9 ± 20.1^a	97.3 ± 14.8^{bc}	24.1 ± 2.5^a
JMT200	284.6 ± 9.2^a	373.1 ± 21.4^a	88.5 ± 17.9^b	22.5 ± 1.0^b

All values are mean $\pm$ SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

Fig. 1. The effects of JMT on the HO-1 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

All values are mean ± SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

Fig. 2. The effects of JMT on the p-IκBα protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

All values are mean ± SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

4. 혈청 내 anti-type II collagen antibody 측정

Con은 N에 비하여 유의성 있는 증가를 보였으며, JMT100과 JMT200은 Con에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다(Table V).

5. 관절 조직 내 항산화 단백질 분석

1) HO-1

HO-1는 N 1.00 ± 0.11 , Con 0.74 ± 0.26 , Indo 0.84 ± 0.12 , JMT100 0.94 ± 0.28 , JMT200 1.09 ± 0.2 로 나타났으며, Con은 N에 비하여 유의성 있는 감소를 보였으며, Con에 비하여 JMT200은 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 1).

6. 관절 조직 내 염증 cytokine 및 매개 인자 분석

1) p-IκBα

p-IκBα는 N 1.00 ± 0.07 , Con 1.29 ± 0.06 , Indo 1.08 ± 0.08 , JMT100 1.17 ± 0.07 , JMT200 1.04 ± 0.04 로 나타났으며, Con은 N에 비하여 유의성 있는 증가를 보였으며, Con

Fig. 3. The effects of JMT on the COX-2 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

All values are mean ± SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

에 비하여 JMT200은 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2).

2) COX-2

COX-2는 N 1.00 ± 0.04 , Con 1.14 ± 0.03 , Indo 0.92 ± 0.04 , JMT100 1.00 ± 0.06 , JMT200 1.01 ± 0.05 로 나타났으며, Con은 N에 비하여 유의성 있는 증가를 보였으며, Con에 비하여 JMT100과 JMT200은 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

3) iNOS

iNOS는 N 1.00 ± 0.25 , Con 1.31 ± 0.17 , Indo 1.08 ± 0.27 , JMT100 1.12 ± 0.21 , JMT200 1.09 ± 0.28 로 나타났으며, Con은 N에 비하여 유의성 있는 증가를 보였으며, Con에 비하여 JMT100과 JMT200은 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4).

4) TNF- α

TNF- α 는 N 1.00 ± 0.20 , Con 1.14 ± 0.21 , Indo

0.95 ± 0.18 , JMT100 1.04 ± 0.21 , JMT200 0.99 ± 0.16 로 나타났으며, Con에 비하여 JMT200은 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 5).

7. 조직병리학적 변화 관찰

1) H&E stain

N은 활막 조직, 연골 조직이 정상적인 반면 Con은 골관절염 유발로 인해 활막 조직과 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. Indo, JMT100과 JMT200은 Con과 비교하여 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되었다(Fig. 6).

2) Safranin-O stain

N은 관절 조직과 proteoglycan이 정상적으로 관찰되었으나, Con은 골관절염 유발로 인해 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 관찰되었다. 반면 Indo, JMT100과 JMT200은 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 억제되었다(Fig. 7).

Fig. 4. The effects of JMT on the iNOS protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

All values are mean $\pm$ SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

Fig. 5. The effects of JMT on the TNF- α protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

All values are mean $\pm$ SD (n=8).

JMT: *Jinmu-tang* extract, N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, Indo: MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, JMT100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, JMT200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight.

Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

Fig. 6. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat (H&E staining, $\times 40$). (A) Normal rat, (B) MIA-induced osteoarthritis rat, (C) MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, (D) MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, (E) MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight. H&E: Hematoxylin and eosin, JMT: *Jinmu-tang* extract.

Fig. 7. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat (Safranin-O staining, $\times 40$). (A) Normal rat, (B) MIA-induced osteoarthritis rat, (C) MIA-induced osteoarthritis rat treated with indomethacin 5 mg/kg body weight, (D) MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 100 mg/kg body weight, (E) MIA-induced osteoarthritis rat treated with JMT 200 mg/kg body weight. JMT: *Jinmu-tang* extract.

고찰»»»

골관절염은 보행시 통증이 발생하며, 휴식하면 사라지는 특징을 가지고 있으며, 병이 진행되면 가벼운 접촉에서 통증이 느껴지고 날씨 변화에도 민감하게 반응하는 양상이 나타난다²³⁾. 이러한 상황이 만성적으로 지속되면 관절의 구조가 변하게 되며²⁴⁾, 관절 사용이 감소하여 근력이 약화되고 가동성이 나빠져 관절의 강직감이 발생되고 신체 기능이 저하되어 사회 활동까지 제한을 받게 된다²⁵⁾.

병태생리적으로 골관절염에서 관찰되는 가장 특징적인 현상은 연골의 파괴이며, 골극의 형성, 연골하 골의 경화와 활막염증, 미세골절도 나타날 수 있다. 연골 세포의 파괴는 type II collagen, proteoglycan 등의 생산이 감소되고 세포외기질이 분해되면서 진행되며, 점차적으로 연골의 기본 구조가 파괴되어 관절에 부하되는 체중을 견디지 못하게 된다²⁶⁾.

한의학에서의 골관절염은 痺證의 범주로 인식되어 왔다. 관절은 인체의 운동기관이자 氣血이 지나가는 중요한

부위이지만, 風, 寒, 濕의 外邪가 쉽게 관절을 침범하여 통증, 활동 장애, 부종 등을 일으킨다. 이러한 병리 변화가 관절에서 일어나므로 골관절염은 關節痺證이라고도 불린다¹⁾.

골관절염은 노령인구가 지속적으로 증가함에 따라 노인의 삶의 질을 저하시키는 대표적인 질환 중의 하나이지만 현재까지 진행을 차단할 수 있는 확실한 치료법이 없기 때문에²⁷⁾ 골관절염의 치료에 대한 관심이 높아질 것으로 예상된다.

한의학에서는 한약의 단미제, 복합제제를 이용한 항산화, 항염증 등에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 이를 토대로 골관절염에 대한 연구도 한약제제^{28,29)} 뿐만 아니라 약침^{30,31)}을 사용한 연구까지 폭넓게 진행되고 있다.

眞武湯은 溫陽利水の 효능을 가지고 있으며⁷⁾, 이는 寒濕의 外邪가 관절에 침범하여 나타나는 퇴행성관절염의 대표적인 증상인 虛冷, 浮腫을 완화시켜줄 수 있다. 또한 眞武湯을 구성하는 각 약재들은 염증의 억제^{12,14-17)}, 항산화¹⁵⁾, 진통 작용¹³⁾을 가지고 있으며, 최 등⁸⁾은 眞武湯의 뇌신경 보호 효과를 실험한 연구에서, 眞武湯이 항산화 및 항염증의 효능을 가지고 있다고 밝혔다. 따라서 眞武湯이 골관절염을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

골관절염을 유발하기 위하여 사용된 MIA는 관절의 퇴행성 변화를 일으키는 대표적인 물질로, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성화를 억제하여 해당 작용을 방해하고, 연골세포의 대사에 영향을 주어 세포사멸을 일으켜 연골을 손상시킨다. 또한, 윤활막의 손상으로 관절 표면이 거칠어지고, 표면의 세포층이 상실되어 연골 밑의 뼈가 노출되게 된다³²⁻³⁴⁾. 따라서 MIA로 유발된 골관절염은 인간에게서 나타나는 퇴행성 관절염과 매우 유사하고³⁵⁾, MIA의 농도 조절을 통하여 관절염의 심한 정도, 발생 시기를 제어할 수 있으며, 관리하기 쉽기 때문에³⁶⁾, 골관절염이 유도된 동물에 대한 한약의 효과를 알아보기 위한 연구에 다양하게 응용되고 있다²⁹⁻³¹⁾.

먼저, 眞武湯의 항산화 효과를 알아보기 위하여 polyphenol 및 flavonoid의 함량과 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 알아보았다.

Polyphenol 화합물은 flavonoid, anthocyanin, catechin, isoflavone, lignan, resveratrol, tannin 등으로, 식물체에 널리 분포되어 있으며, 폴리페놀의 많은 히드록실기(-OH)는 다양한 화합물들과 쉽게 결합하므로 항산화 효과 및

항염, 항암 효과가 매우 뛰어나다^{37,38)}. 그 중, flavonoid는 polyphenol과 마찬가지로 항염증, 항바이러스, 항암 등의 효과가 있으며, 활성산소를 제거하는데 매우 효과적이므로 항산화능이 높은 물질이다³⁹⁾.

DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 폐놀성 물질의 농도가 높을수록 소거능 또한 높아지며, DPPH와 ABTS의 소거활성은 유의적인 상관관계를 가지고 있으나, 라디칼의 종류에 따라 폐놀성 물질이 선택적으로 작용될 수 있기 때문에 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 모두 측정하는 것이 효과적이다⁴⁰⁾. 그리고 JMT와 비교하기 위하여 양성대조군으로 사용된 비타민 C 라고도 불리는 L-ascorbic acid는 세포 내의 가장 강력한 항산화 비타민으로 알려져 있다⁴¹⁾.

JMT의 total polyphenol과 flavonoid의 측정 결과는, 각각 26.90 ± 0.33 mg/g과 6.02 ± 0.34 mg/g의 함량을 나타냈으며(Table II), DPPH radical 소거능에서 JMT의 IC₅₀ 값은 52.95 ± 0.97 μ g/ml, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.35 ± 0.07 μ g/ml을 나타냈으며, ABTS radical 소거능에서 JMT의 IC₅₀ 값은 91.49 ± 1.74 μ g/ml, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.18 ± 0.02 μ g/ml로 나타나(Table III), 항산화, 항염증의 효과가 있을 것으로 생각된다.

체중 및 식이 섭취량 측정에서, 식이 섭취량은 Con과 비교하여 JMT 투여군에서 유의한 차이를 나타내지 않았지만, 체중 증가량은 Con과 비교하여 JMT200에서 유의하게 낮았다(Table IV). 골관절염 유발 후 Con의 실험쥐들은 관절의 통증으로 인하여 실험기간 동안 활동량의 감소를 보였으나, JMT200에서는 빠른 회복을 보이며 활동량이 증가되었기 때문으로 사료된다.

혈청 내 anti-type II collagen antibody의 수치는 peroxynitrite (ONOO-)와 산화적 스트레스를 형성하는데 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁴²⁾.

혈청 내 anti-type II collagen antibody 측정에서 JMT 투여군은 모두 Con보다 유의성 있는 감소를 나타내어(Table V) 산화적 스트레스를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

HO는 heme을 분해하는 과정의 속도를 조절하는 효소로 biliverdin, free iron, CO 등을 생성한다⁴³⁾. 그 중, HO-1는 heat shock protein의 한 종류로, 다양한 스트레스 자극에 유도되어 세포보호, 항산화, 항염증 등의 생체 방어 기전을 가진 것으로 알려져 있다^{44,45)}.

HO-1 측정에서 JMT200이 Con에 비하여 유의성 있는

증가를 나타내었으며 Indo와 비교하여서도 유의성 있게 증가되어(Fig. 1) 세포보호, 항산화 및 항염증의 작용이 뛰어날 것으로 생각된다.

NF- κ B dimmer (p65/p50)는 I κ B라는 억제단백질과 복합체를 형성하여 불활성의 상태로 세포질에 머물지만, 세포의 자극을 받게 되면 I κ B가 phosphorylation, ubiquitination, degradation 과정을 거치며 파괴되어 NF- κ B는 자유로워지게 된다. 이후, NF- κ B는 세포질에서 핵으로 translocation 되는데, 이 때 활성형이 되어 염증관련 인자들을 활성화시키는 전사인자가 된다. 따라서 I κ B α 의 분해는 NF- κ B의 활성화에 필수적이며, 이 과정은 I κ B의 인산화에 의존하기 때문에, I κ B α 의 인산화를 막음으로써 NF- κ B의 활성화가 조절된다⁴⁶⁾.

p-I κ B α 측정에서 Con에 비하여 JMT200은 유의성 있는 감소를 나타내어(Fig. 2), JMT는 I κ B와 NF- κ B 복합체에서 I κ B의 인산화를 감소시켜 염증반응을 억제하는 것으로 사료된다.

COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변화시키며 COX-1과 COX-2의 형태로 존재한다. COX-1은 생체 내의 대부분의 조직에서 발현하는 반면 COX-2는 호소단백질로, 유도성의 형태로 염증부위에 많은 양의 전염증성 prostaglandin 생산에 반응하여 염증을 일으킨다⁴⁷⁾. 또한, macrophage가 염증활성 상태에서 iNOS를 다량 생산하는데, arginine으로부터 생산된 과도한 NO는 부종을 일으키고 혈관투과성을 증가 시키는 등의 염증반응을 촉진하게 되어 조직 손상, 신경 손상, 유전자 변이를 유발시키는 전염증성 인자로서 작용을 하게 된다⁴⁸⁾. 그리고 전염증성 cytokine으로 알려진 TNF- α 는 골관절염 진행시 macrophage의 증가로 인해 생산도 증가되며, 또 다른 다양한 염증매개체들의 유도, 면역반응의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다⁴⁹⁾.

COX-2와 iNOS 측정에서, JMT100과 JMT200에서 Con에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며(Fig. 3, 4), TNF- α 측정에서 JMT200에서 Con에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 5). 따라서 JMT는 관절 조직에서의 염증 cytokine 및 매개인자의 반응에 관여하여 염증 반응을 억제시킨다고 할 수 있다.

H&E와 Safranin-O 염색은 무릎 관절내의 연골세포, 섬유조직, 활막세포의 병리조직학적 관찰을 용이하게 해준다. 특히, H&E 염색은 슬관절의 성분 변화를 관찰할 수

있는데, Hematoxylin은 호염기성으로 nucleus와 proteoglycan을 청색으로, Eosin은 호산성으로 cytoplasm을 적색으로 염색한다. Safranin-O는 양이온성 염색소로서 음이온성 전하군과 결합하기 때문에, 연골에 분포하는 proteoglycan의 양에 비례하여 오렌지색 또는 적색으로 염색되어 연골의 proteoglycan 농도의 증감을 추정할 수 있다⁵⁰⁾.

무릎 관절 조직에 H&E 염색을 실시한 결과, Con은 관절 조직의 변형이 크게 일어난 반면, JMT100과 JMT200은 Con에 비하여 활막조직, 연골조직, 섬유조직 모두 변형이 비교적 많이 억제되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 또한, 무릎 관절 조직의 Safranin-O 염색 후 관찰한 결과에서도, Con의 관절 조직은 proteoglycan의 파괴가 많이 관찰된 반면, JMT100과 JMT200은 관절조직이 양호하게 보호되어 proteoglycan의 염색이 많이 관찰되었다(Fig. 7). 따라서 JMT는 골관절염이 유발된 흰쥐의 무릎 관절을 병리조직학적으로 보호하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 JMT의 항산화능 지표를 통하여 항산화의 효능을 확인하였으며, MIA로 유도된 골관절염 흰쥐에서 산화적 스트레스 억제, 염증 cytokine과 매개인자 발현의 억제와 병리조직학적 변화 억제를 통하여 관절조직을 보호하는 효과를 확인하였기에, 골관절염의 치료제 개발에 도움될 수 있으리라 사료된다.

결론»»»

眞武湯이 MIA로 유도된 골관절염 흰쥐에 미치는 영향을 실험 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. JMT의 total polyphenol과 total flavonoid를 측정한 결과는 각각 26.90 ± 0.33 mg/g과 6.02 ± 0.34 mg/g이었으며, DPPH radical 소거능에서 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.35 ± 0.07 μ g/ml, JMT의 IC₅₀ 값은 52.95 ± 0.97 μ g/ml를 나타냈다. ABTS radical 소거능에서 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.18 ± 0.02 μ g/ml, JMT의 IC₅₀ 값은 91.49 ± 1.74 μ g/ml의 값을 나타냈다.

2. 혈청 내 anti-type II collagen antibody는 대조군에 비하여 모든 JMT 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈다.

3. 관절 조직 내 HO-1은 대조군에 비하여 JMT 200에서 유의성 있는 증가를 나타냈다.

4. 관절 조직 내 p-I κ B α 는 대조군에 비하여 JMT200에서 유의성 있는 감소를 나타냈다. COX-2, iNOS는 대조군에 비하여 모든 JMT 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈으며, TNF- α 는 대조군에 비하여 JMT200에서 유의성 있는 감소가 나타났다.

5. 병리조직학적 변화 관찰에서 대조군에 비하여 모든 JMT 투여군은 활막과 연골 조직의 변화 및 proteoglycan의 파괴가 억제되었다.

이상의 결과로 보아, MIA로 유도된 골관절염 흰쥐 모델에서 眞武湯은 산화적 스트레스를 억제하고, 염증 cytokine과 매개인자의 발현을 억제하여 관절 조직을 보호하는 효능이 있으므로, 골관절염의 진행을 억제시켜 임상에서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References>>>>

1. The Society of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine. Korean Rehabilitation Medicine. 4th edition. Seoul:Kunja Publishing INC. 2015:115-6.
2. Jhun HJ, Ahn K, Lee SC. Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and nutrition examination survey. Anesthesiology and Pain Medicine. 2010;5(3):1229-307.
3. Ministry for Health and welfare. Elderly real state survey. Seoul, Ministry for Health and Welfare. 2009.
4. Vennu V, Bindawas SM. Relationship between falls, knee osteoarthritis, and health-related quality of life: Data from the osteoarthritis initiative study. Clinical Interventions in Aging. 2014;9:793-800.
5. Park HJ, Lee SK. The association between osteoarthritis and health-related quality of life in women aged 50 years and over: Using the Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES) data. Korean Journal of Health Education and Promotion. 2012;29(2):23-32.
6. Zhang ZJ. Sanghanron-ganghae. Henan;Henan science and technology press. 1988:102-4.
7. Kim SC, Kim SH, Noh SH, Park SD, Kim SK, Seo BI, Seo YB, Shin SS, Lee SI, Lee JC, Lee TH, Joo YS, Choi HY. Herbal formula science. Seoul:Younglimsa. 2003:516-7.
8. Choi JH, Shin YJ, Ha YJ, Cho MY, You JY, Lee SI, Shin SH. Protective Effect of *Jinmu-tang* on H₂O₂-induced Cell Death in C6 Glial Cells. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2012;33(3):272-83.
9. Choi IG, Chae EY, Chang SK, Cho CS, Kim CJ. Effects of *Jinmutang* (JMT) on Hypothyroidism in Rats. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2006;27(4):879-87.
10. Lee KH, Kim GW. Effects of *Jinmootang* on the Gentamicin-induced Nephrotoxicity in Rats. Journal of Oriental Physiology. 1999;14(2):189-98.
11. Ahn YM, Ahn SY, Doo HK, Lee TW, Park JK. The Effects of *Jinmu-tang* on Mesangial Cell Proliferation, Fibronectin Synthesis and Expression of ICAM-1, β 1-Integrin, MHC-Class II. Journal of Korean Oriental Med. 2000;21(3):40-50.
12. Bin CH, Song CH. Ameliorating Effects of *Atractylodes macrocephala Koidzumi* on TNF- α -induced 3T3-L1 Adipocyte Dysfunction. Korean Journal of Acupuncture. 2015;32(3):116-23.
13. Herbology editorial committee of Korean medicine schools. Herbology. Seoul:Younglimsa. 2007:634-5.
14. Koh DK, Yun JM, Lee TH. Effects of *Aconiti Tuber* on the change of Interleukin-6 and TNF- α level induced by LPS I.C.V. injection in mice. The Korean journal of oriental medical prescription. 2004;12(1):195-208.
15. Zhou L, Zhang Y, Gapter LA, Ling H, Agarwal R, Ng KY. Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2008;56(10):1459-62.
16. Fuchs SM, Heinemann C, Schliemann-Willers S, Härtl H, Fluhr JW, Elsner P. Assessment of anti-inflammatory activity of *Poria cocos* in sodium lauryl sulphate-induced irritant contact dermatitis. Skin Research and Technology. 2006;12(4):223-7.
17. Jung HW, Yoon CH, Park KM, Han HS, Park YK. Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. Food and Chemical Toxicology. 2009;47(6):1190-7.
18. Heo J. Dongeuibogam. Seoul:Bubin publishers. 2007:1159.
19. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J Agric Food Chem. 1998;46:4113-7.
20. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JRL. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1994;64(2):155-61.
21. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. Effects of the Interaction of Tannins with Co-existing Substances. VI. : Effects of Tannins and Related Polyphenols on Superoxide Anion Radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1989;37(8):2016-21.

22. Martins JLR, Rodrigues ORL, da Silva DM, Galdino PM, de Palula JR, Romao W, da Costa HB, Vaz BG, Ghedini PC, Costa EA. Mechanisms involved in the gastro-protective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacol.* 2014;155(3):1616-24.
23. Bennell K, Hinman R. Exercise as a treatment for osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology.* 2005; 17(5):634-40.
24. Arden NK, Crozier S, Smith H, Anderson F, Edwards C, Raphael H, Cooper C. Knee pain, knee osteoarthritis, and the risk of fracture. *Arthritis and Rheumatism.* 2006;55(4):610-5.
25. Fransen M, Naim L, Winstanley J, Lam P, Edmonds J. Physical activity for osteoarthritis management: a randomized controlled clinical trial evaluating hydrotherapy or Tai Chi classes. *Arthritis and Rheumatism.* 2007;57(3): 407-14.
26. Yoon CH. Osteoarthritis Update. *Korean journal of internal medicine.* 2012;82(2):170-4.
27. Baek SH, Kim SY. Pharmacologic treatment of osteoarthritis. *Journal of the Korean Medical Association.* 2013;56(12):1123-31.
28. Won JY, Jeong JW, Na CS, Kim SJ. Analgesic Effects of ChondroT in Collagenase-induced Osteoarthritis Rat Model. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2016; 26(3):17-30.
29. Lee JH, Woo CH, Kim YJ, Ahn HD. Effects of *Seungseup-tang* on MIA-induced Osteoarthritis Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2016;26(3):1-15.
30. Lee YE, Lee YK, Kim JS, Lee HJ. Effects of *Clematidis Radix* Pharmacopuncture on MIA induced Osteoarthritis Rat. *Korean Journal of Acupuncture.* 2016;33(2):35-49.
31. Lee HJ, Park JO, Oh MS. Anti-inflammation and Anti-oxidation Effects of *Gamkiyejakjimo-tang* Herbal Acupuncture on Pathologic Factor and MIA-induced Osteoarthritis Rat. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2015;25(4): 1-20.
32. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats?. *Neuroscience Letters.* 2004;370(2-3): 236-40.
33. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004;112(1-2):83-93.
34. Dumond H, Presle N, Pottier P, Pacquelet S, Terlain B, Netter P, Gepstein A, Livne E, Jouzeau JY. Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(4):284-95.
35. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S, Taiwo YO. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(8):751-60.
36. Schuelert N, McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neuroscience Letters.* 2009;465(2): 184-8.
37. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* 2002;82(1):47-95.
38. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15(10):7313-52.
39. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 2012; 44(3):337-42.
40. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1998;46(12):4869-73.
41. Liao ML, Seib PA. Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. *Food Chemistry.* 1988;30(4):289-312.
42. Deberg M, Labasse A, Christgau S, Cloos P, Bang Henriksen D, Chapelle JP, Zegels B, Reginster JY, Henrotin Y. New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO₂) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2005;13(3):258-65.
43. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1970;75(3):410-21.
44. Amon M, Menger MD, Vollmar B. Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB Journal.* 2003;17(3):175-85.
45. Ke B, Shen XD, Zhai Y, Gao F, Busuttill RW, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy *in vivo* and *in vitro*. *Human Gene Therapy.* 2002;13(15):1845-57.
46. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *Journal of Cell Science.* 2005;118:4589-92.
47. 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 Immunology Medical and Microbiology. 2002;34(3): 187-91.
48. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytotherapy Research*. 2003;17(5):485-9.
49. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1796-808.
50. Lee SH, Kwon KD, Lee SW, Cho SH, Ahn HS. Acetabular degeneration in osteonecrosis of the femoral head. *The Journal of the Korean orthopaedic association*. 2004;39(3):239-46.