강황(薑黃) 약침이 Monosodium Iodoacetate 유도 골관절염 흰쥐에 미치는 영향

이종훈 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of *Curcumae Longae Rhizoma* Pharmacopuncture on Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis Rats

Jong-Hoon Lee, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

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

Objectives The purpose of this study was to evaluate the effects of *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture on the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats.

Methods Osteoarthritis was induced by injection of MIA (50 μ L with 80 mg/mL) into knee joint cavity of rats. Rats were divided into 6 groups. Normal group was injected by normal saline into knee joint cavity only. Control group was induced for osteoarthritis by MIA and orally administered with distilled water. Normal Saline group was induced for osteoarthritis by MIA and injected with normal saline 100 μ L. Positive comparison group was injected with MIA and orally administered with indomethacin 5 mg/kg. *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration (CL) group was induced for osteoarthritis by MIA and injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L. *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration (CH) group was induced for osteoarthritis by MIA and injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture was injected at ST35 and EX-LE4 each group (CL, CH). After that, hind paw weight distribution was measured and oxidative stress biomarker in serum, liver function biomarker in serum, western blot analysis were measured. Histological analysis of knee joint tissue was performed by hematoxylin and eosin staining, Safranin-O staining and Masson's trichrome staining.

Results Hind paw weight distribution was significantly improved in both group. alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were decreased significantly in CH group compare with Indomethacin threatened group. Antioxidant enzyme glutathione peroxidase, Catalase and heme oxygenase-1 were increased in CH group compare with control group. Inflammatory cytokine cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 beta were decreased significantly in CH group. Histological analysis result shows that protective effects of joint and cartilage were observed in both CH and CL groups in a concentration-dependent.

Conclusions The result suggest that *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture has anti-oxidation effect, anti-inflammatory effect and also can prevent progression of osteoarthritis and protect joint cartilage. (J Korean Med Rehabil 2019;29(2):115-133)

Key words *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture, Osteoarthritis, Anti-oxidation, Anti-inflammation, Monosodium iodoacetate (MIA)

RECEIVED January, 17, 2019

ACCEPTED April, 3, 2019

CORRESPONDING TO

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

TEL (054) 271-8006

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2019 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

서론»»»

성인에서 가장 흔한 관절 질환인 골관절염은 퇴행성 관절 질환 또는 변형성 관절증으로도 불리며 연골의 손상과 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등의 특징을 가지고 있다. 주 증상은 관절통, 압통, 경직, 잠김감, 부종 등이고 염증 변화가 소수에서 나타나며, 관절 염발음이나 근육 경련이 동반되기도 한다^{1,2)}.

골관절염은 관절의 통증과 굴신불리 등을 주 증상으로 하여 한의학에서 痺病證의 범주에 해당한다. 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 正氣가 허한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 關節에 응체됨으로써 血氣運行을 저해하여 발생하는 것으로 보고 있다¹⁾. 골관절염에 대한 한의학적 치료는 침구 치료, 한약치료, 물리치료 외에 매선요법, 약침 등이 임상에서 사용되고 있다³⁾. 특히 자침과 약물의 효과를 함께 적용할 수 있는 약침요법⁴⁾은 최근 많은 연구가 진행되었다.

특히 최근에 약침으로 많이 응용되고 있는 薑黃 (*Curcuma longa Rhizoma*)은 活血去瘀藥으로 破血行氣, 通經止痛 하는 효능이 있어 心腹痞滿脹痛, 經閉, 癥瘕風濕肩臂疼痛, 跌撲腫痛 등의 증상에 응용된다⁵⁾. 薑黃에 관하여 항암 효과⁶⁾, 항산화 효과⁷⁾, 항염증 효과⁸⁾ 등의 효능에 대한 다양한 연구들이 보고되었으나 monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 골관절염에 대한 薑黃 약침에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 薑黃 약침이 골관절염에 미치는 영향을 규명하고자 MIA로 골관절염을 유도한 흰쥐에 薑黃 약침을 시술하여 뒷다리 체중 부하 검사, 혈액학적 분석, 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정, 슬관절 조직의 단백질 분석과 병리조직학적 검사를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 동물

대한바이오링크(Daehanbiolink, Eumseong, Korea)에서 공급하는 7주령의 수컷 Sprague-Dawley Rat (200~250 g)을

공급받았고, 실험 당일까지 고형 사료(Samyang corporation, Seoul, Korea)와 물을 충분히 공급하고, 온도($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), 습도($55\pm 5\%$)가 조절된 사육실에서 12시간 light-dark cycle 환경을 유지하며 1주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(승인 번호: DHU2016-043)을 받았다.

2) 시약

본 실험에 사용된 MIA, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Nuclear factor-kappa Bp65 (NF- κ Bp65), nuclear factor erythroid 2 (Nrf2), catalase, glutathione peroxidase (GPx), catalase, heme oxygenase-1 (HO-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), NADPH oxidase 4 (NOX4), p47^{phox}, histone, β -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2) 1차 항체는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였고, Protease inhibitor mixture, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 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 구입하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3) 약재 및 약침액 제조

본 실험에서 사용한 薑黃 (*Curcuma longa Rhizoma*)은 옹기한약국(Onggi Hanyakgook, Daegu, Korea)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사하여 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다. 10 g 분량에 증류수 100 mL를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 추출액을 감압 증류장치로 농축한 후 이를 다시 동결 건조하여 완전 건조한 분말(3.18 g, 31.8%)을 얻었으며 이

薑黃 분말 3 g에 증류수 30 mL를 가하여 녹인 후 98% 에탄올 120 mL를 혼합하고 그 혼합액을 NO 2. paper filter를 이용하여 여과하였다. 그 후 여과액이 30 mL가 되도록 감압농축을 한 후 농축된 여과액에 추가로 98% 에탄올 120 mL를 혼합한 후 NO 2. paper filter를 이용하여 여과하였다. 2차적으로 여과액을 30 mL로 감압농축한 후 실험에 사용하기 직전까지 냉장 보관하였다가 실험 시엔 0.45 μ m 실린지 필터를 사용하여 여과한 후 薑黃 약침원액을 6배 희석한 것을 고농도로 하고 다시 이를 6배 희석한 것을 저농도로 하였다. MIA로 관절염을 유발시킨 후 생리식염수군과 薑黃 약침군은 각각 생리식염수와 薑黃 약침을 1회/2일 100 μ L씩 일정한 시간에 주입하였다. 두 군 모두 시술은 犢鼻 (ST35)와 膝眼 (EX-LE4) 부위에 피하 2 mm 깊이로 주입하였고, 약침주입기는 BD Ultra-Fine II Insulin Syringe (BD Medical-Diabetes Care, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 100 μ L를 주입하였다.

4) 실험 기기

본 실험에 사용된 기기는 전자체중계(Cas, Yangju, Korea), AE-6530 mPAGE (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea), DWT-1800T (Daewoong Bio, Hwaseong, Korea), vortex mixer, 동결건조기(Labconco, Kansas City, MO, USA), Deep-freezer (Sanyo Co., Tokyo, Japan), Infinite m200 pro 흡광도 측정기(Tecan, Männedorf, Switzerland), Incapacitance Meter Tester 600 (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA), BX-51 편광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan), 냉장 초고속 원심 분리기(Labogene, Seoul, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 투여와 군 분리

실험군은 총 6개의 군으로 아무런 처치를 하지 않은 정상군(Nor), MIA로 골관절염 유발 후 증류수를 경구 투여한 대조군(Con), MIA로 골관절염 유발 후 normal saline 주사 투여군(NS), MIA로 골관절염 유발 후 indomethacin 5 mg/kg 경구 투여군(Indo), MIA로 골관절염 유발 후 *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture 저농도 주사 투여군(CL), MIA로 골관절염 유발 후 *Curcuma Longae*

Rhizoma pharmacopuncture 고농도 주사 투여군(CH)으로 총 6군으로 각각 8마리씩 군 분리하였다.

대조군(Con)과 양성 대조군(Indo)은 매일 경구 투여하였고 NS 주사 투여군과 薑黃 약침 주사 투여군들은 MIA로 골관절염 유발 1주일 후부터 군 분리한 뒤 犢鼻 (ST35)와 膝眼 (EX-LE4) 부위에 피하 2 mm 깊이로 1회/2일 주입하였고, 2주간 진행하였다.

군 분리는 아래와 같이 하였다.

- (1) 정상군(Nor): 골관절염을 유발시키지 않은 정상군
- (2) 대조군(Con): MIA로 골관절염 유발 후 증류수를 경구 투여군
- (3) 생리식염수 투여군(NS): MIA로 골관절염 유발 후 normal saline 100 μ L 주사 투여군
- (4) Indomethacin 투여군(Indo): MIA로 골관절염 유발 후 indomethacin 5 mg/kg 경구 투여군
- (5) 薑黃 약침액 저농도 투여군(CL): MIA로 골관절염 유발 후 薑黃 약침액 저농도 100 μ L 주사 투여군
- (6) 薑黃 약침액 고농도 투여군(CH): MIA로 골관절염 유발 후 薑黃 약침액 고농도 100 μ L 주사 투여군

2) MIA에 의한 골관절염 유발

정상군을 제외한 Rat에 마취제 Zoletile mixture (Vibrac, Carros, France)를 3.5 mg/kg을 복강에 투여하여 마취시켰다. 실험동물의 오른쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA를 0.3 mL insulin 주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 μ L (80 mg/mL)씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9% saline을 사용하였다.

3) 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 전자체중계로 1회/2일로 동일 시간 동일 조건에서 측정하였고, 식이섭취량은 2일 동안 제공된 사료에서 2일간 섭취하고 남은 사료량을 측정 후 각 실험군의 하루 사료섭취량을 산출하였다.

(1) 체중(body weight)

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

(2) 식이섭취량(food intake)

$$1\text{일 평균식이섭취량} = \frac{\text{총 식이섭취량 (Total food intake)}}{15 \text{ days}} \times 100$$

4) 뒷다리 체중 부하 측정

약침액은 2일 1회 오전 투여, 측정은 오후에 하는 것을 원칙으로 하였다. 측정일은 MIA 주사 전날, 주사 후 7일, 14일과 21일에 각각 시행하였다. Incapacitance tester (Ser No. 01/45/25, Linton instrument Co., Palgrave, UK)를 이용하여 오른쪽, 왼쪽 뒷다리 무게를 각각 측정하였다. MIA에 의해 골관절염이 유발되면, Rat은 MIA를 투여하지 않은 다리에 의지하여 tester의 holder 안에 서게 하였다. Rat의 배가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 왼쪽, 오른쪽 각각의 발 무게(g)를 측정하여 나타냈다. 실험 결과는 관절염이 유발된 뒷다리(오른쪽 뒷다리)의 체중 부하량에 대한 정상 뒷다리(왼쪽 뒷다리)의 체중 부하량을 계산하여 체중 부하 비율을 계산하고, 정상군의 체중 부하 비율에 각 군의 체중 부하 비율을 계산하여 평균±표준편차로 표시하였다.

$$\text{I} \text{ 체중부하비율} = \frac{\text{정상뒷다리의 체중부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중부하량}}$$

$$\text{II} \text{ 상대적 체중 부하} = \frac{\text{각 군의 체중부하비율}}{\text{정상군의 평균 체중부하비율}} \times 100$$

5) 혈청 내 간 손상 지표 분석

복대정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻었고 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

6) 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

복대정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻었고 Reactive Oxygen Species (ROS)를 측정하기 위하여 25 mM DCF-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩 530 nm 방사파장 (emission wavelength)과 485 nm 여기파장(excitation wavelength)을 이용하여 30분간 측정한 산출값을 계산하였다. 혈청에서 ROS를 측정하기 위하여 Kooy 등⁸⁾의 방법을 시행하였다.

7) Western blot 분석

관절조직의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심 분리하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 μL의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 뒤 10분마다 vortex를 세 번하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80℃에서 각각 냉동 보관하였다. 관절조직 세포질 내의 GPx, Catalase, HO-1, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, NOX4, p47^{phox}, MMP-2, MMP-9, TIMP2, β-actin 및 핵의 NF-κBp65, Nrf2, histone 단백질의 발현을 측정하기 위해 10 μg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(PBS-T로 1:3,000으로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 ECL 용액을 GE Healthcare (Little Chalfont)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

8) 조직병리학적 분석

실험 종료 후 슬관절 부위를 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% 포르말린(formalin) 용액에 넣어 관절을 탈회(decalcification)시켰다. Radiographic technique을 이용하여 탈회 유무를 확인한 후 parafin wax에 관절을 넣고 고정된 다음 coronal section을 실시하였다. 탈회 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 μm의 크기로 자른 뒤,

hematoxylin and eosin (H&E)와 Masson's trichrome (M-T) 및 Safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증 세포의 조직 침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인하였다. Proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인하였다.

9) 통계 분석

모든 실험은 평균과 표준오차로 표시하였다. SPSS version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 유의수준 p -value < 0.05 에서 검증하였다.

결과»»»»

1. 체중 및 식이섭취량

MIA로 골관절염 유발 후 2주 동안 모든 군에서 체중이 증가하였으며 대조군과 비교하였을 때 각 군들 간의 체중 변화량에는 유의성이 없었고, 식이섭취량 또한 각 군들 간의 유의성은 없었다(Table I).

2. 뒷다리 체중 부하의 변화

정상군의 뒷다리 체중 부하 비율을 100으로 하였을 때, 각 군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정한 결과, MIA 투여 1주일 후에는 정상군(96.86 ± 14.57)에 비해 대조군(271.24 ± 105.89)은 증가를 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(227.71 ± 58.22)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(117.88 ± 22.52)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(171.82 ± 84.23)과 CH 투여군(168.91 ± 35.46)에서도 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$).

MIA 투여 2주일 후 뒷다리 체중 부하 변화를 관찰한 결과, 정상군(107.62 ± 15.11)에 비해 대조군(212.68 ± 83.29)은 증가를 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(245.22 ± 65.42)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(110.14 ± 37.34)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(160.19 ± 33.07)과 CH 투여군(116.37 ± 20.50)에서도 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Table II).

3. 혈청 내 간 손상 지표 분석

1) ALT

ALT를 측정한 결과, 정상군(11.16 ± 0.95 IU/L)에 비하여 대조군(9.31 ± 0.64 IU/L)은 감소를 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(13.03 ± 0.80 IU/L)과 양성 대조군(15.39 ± 0.97 IU/L)은 유의성 있는 증가를 나타냈다($p < 0.01$, $p < 0.001$). CL 투여군(7.39 ± 0.39 IU/L)은 감소하는 경향을 나타냈으며,

Table I. Body Weight and Food Intake

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)
Nor	311.1 ± 9.3	362.2 ± 10.8	51.1 ± 7.5	24.8 ± 1.9
Con	295.9 ± 9.7	356.3 ± 19.9	60.3 ± 15.7	26.2 ± 0.9
NS	294.2 ± 6.3	351.5 ± 4.6	57.3 ± 3.1	25.7 ± 0.6
Indo	302.8 ± 8.7	$375.2 \pm 31.4^*$	72.4 ± 29.1	26.6 ± 1.4
CL	286.5 ± 13.9	$335.0 \pm 20.2^*$	48.8 ± 18.9	25.2 ± 2.6
CH	294.6 ± 15.7	339.0 ± 24.3	44.0 ± 19.2	24.9 ± 0.7

All data are expressed means $\pm$ SEM, $n=8$ rats per group.

Nor: normal rats, Con: monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: $^*p < 0.05$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student least-significant differences test.

CH 투여군(4.18 ± 0.44 IU/L)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 1).

2) AST

AST를 측정된 결과, 정상군(87.07 ± 2.02 IU/L)에 비하여 대조군(87.74 ± 4.62 IU/L)은 증가를 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(107.64 ± 12.62 IU/L)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(150.88 ± 10.03 IU/L)은 유의성 있는

증가를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(90.53 ± 7.74 IU/L)은 증가하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군(61.04 ± 4.12 IU/L)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$) (Fig. 2).

4. 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 분석

ROS를 측정된 결과, 정상군($15,113.3 \pm 2,136.8$ fluorescence/min/mL)에 비하여 대조군($37,177.8 \pm 12,411.1$

Table II. The Changes in Relative Hind Paw Weight Distribution in Monosodium Iodoacetate (MIA)-induced Osteoarthritis Rats

Group	0 weeks	1 weeks	2 weeks	3 weeks
Nor	101.06 ± 20.68	91.31 ± 11.92	96.86 ± 14.57	107.62 ± 15.11
Con	95.40 ± 21.49	226.66 ± 124.60	271.24 ± 105.89	212.68 ± 83.29
NS	116.04 ± 28.14	220.46 ± 81.72	227.71 ± 58.22	245.22 ± 65.42
Indo	100.59 ± 12.47	247.60 ± 67.77	$117.88 \pm 22.52^{\dagger}$	$110.14 \pm 37.34^{\dagger}$
CL	107.85 ± 24.15	230.59 ± 72.59	$171.82 \pm 84.23^{\dagger}$	$160.19 \pm 33.07^*$
CH	106.83 ± 25.43	222.22 ± 21.50	$168.91 \pm 35.46^{\dagger}$	$116.37 \pm 20.50^{\dagger}$

All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group.

Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, $^{\dagger}p < 0.01$, $^{\ddagger}p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student least-significant differences test.

Fig. 1. Alanine aminotransferase (ALT) levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 2. Aspartate aminotransferase (AST) levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

fluorescence/min/mL)은 증가하였고 대조군에 비하여 NS 투여군($33,218.8 \pm 15,938.2$ fluorescence/min/mL)은 감소하는 경향이 있었으며, 양성 대조군($23,337.8 \pm 13,844.9$ fluorescence/min/mL)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$). CL 투여군($27,610.0 \pm 6,325.5$ fluorescence/min/mL)과 CH 투여군($25,276.7 \pm 4,636.0$ fluorescence/min/mL) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 3).

5. 관절조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 분석

1) NOX4

NOX4 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.10)과 비교하였을 때 대조군(1.44 ± 0.17)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.35 ± 0.22)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.86 ± 0.07)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(1.12 ± 0.03)은 감소하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군(1.12 ± 0.08)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 4).

2) p47^{phox}

p47^{phox} 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.07)과 비

Fig. 3. Oxidative stress biomarker (Reactive Oxygen Species, ROS) levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. MIA-induced osteoarthritis rats by student least-significant differences test.

교하였을 때 대조군(1.23 ± 0.05)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.31 ± 0.13)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.72 ± 0.22)은 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(0.99 ± 0.07)은 감소하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군 (0.97 ± 0.03)은 유의한 감소를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 5).

6. 관절조직 내 항산화 단백질 분석

1) Nrf2

Nrf2 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.10)과 비교하였을 때 대조군(0.86 ± 0.06)에서 단백질 발현이 감소하였고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.44 ± 0.06)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(1.68 ± 0.24)은 유의성 있는 증가를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(1.49 ± 0.20)은 유의성 있는 증가를 나타냈으며($p < 0.01$), CH 투여군(1.21 ± 0.11)은 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 6).

2) GPx

GPx 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.03)과 비교

Fig. 4. Western blot analysis of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 5. Western blot analysis of p47^{phox} expression; expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means±SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: *p<0.05, ***p<0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

하였을 때 대조군(1.03±0.06)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.12±0.14)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.95±0.09)은 감소하는 경향을 나타냈다. CL 투여군(1.62±0.28)과 CH 투여군(1.95±0.37)은 유의성 있는 증가를 나타냈다(p<0.05, p<0.01) (Fig. 7).

3) Catalase

Catalase 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00±0.09)과 비교하였을 때 대조군(0.92±0.09)에서 단백질 발현이 감소하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군 (0.98±0.17)과 양성 대조군(1.04±0.05)은 증가하는 경향을 나타냈다. CL 투여군(1.52±0.25)과 CH 투여군(2.30±0.40)은 유의성 있는 증가를 나타냈다(p<0.05, p<0.001) (Fig. 8).

4) HO-1

HO-1 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00±0.14)과 비교하였을 때 대조군(0.79±0.08)에서 단백질 발현이 감소하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(0.90±0.08)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.79±0.03)은 변화

Fig. 6. Western blot analysis of nuclear factor erythroid 2 (Nrf2) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means±SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 7. Western blot analysis of glutathione peroxidase (GPx) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means±SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: *p<0.05, **p<0.01 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 8. Western blot analysis of Catalase expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * p <0.05, *** p <0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 9. Western blot analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * p <0.05 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 10. Western blot analysis of nuclear factor-kappa Bp65 (NF- κ Bp65) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L.

가 없었다. CL 투여군(0.97 ± 0.13)은 증가하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군(1.07 ± 0.10)은 유의성 있는 증가를 나타냈다(p <0.05) (Fig. 9).

7. 관절조직 내 염증 cytokine 및 매개 인자 분석

1) NF- κ Bp65

NF- κ Bp65 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.19)과 비교하였을 때 대조군(1.12 ± 0.09)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.47 ± 0.24)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.98 ± 0.09)은 감소하는 경향을 나타냈다. CL 투여군(1.07 ± 0.11)과 CH 투여군(1.00 ± 0.04)도 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 10).

2) COX-2

COX-2 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.13)과 비교하였을 때 대조군(1.45 ± 0.16)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.63 ± 0.19)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.61 ± 0.04)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$). CL 투여군(1.19 ± 0.15)은 감소하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군(1.05 ± 0.04)에서 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 11).

3) iNOS

iNOS 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.17)과 비교하였을 때 대조군(1.83 ± 0.13)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.69 ± 0.35)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.71 ± 0.08)은 유의성 있는 감소를 나타냈다 ($p < 0.001$). CL 투여군(1.42 ± 0.21)은 감소하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군(1.30 ± 0.04)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 12).

4) TNF- α

TNF- α 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.10)과 비교하였을 때 대조군(1.37 ± 0.18)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.35 ± 0.22)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.86 ± 0.07)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$). CL 투여군(1.17 ± 0.08)과 CH 투여군(1.12 ± 0.03)은 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 13).

5) IL-1 β

IL-1 β 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.11)과 비교하였을 때 대조군(2.04 ± 0.34)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(2.01 ± 0.32)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(1.04 ± 0.21)은 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$). CL 투여군(1.13 ± 0.15)과 CH 투여군(1.17 ± 0.16) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.01$) (Fig. 14).

Fig. 11. Western blot analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 12. Western blot analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 13. Western blot analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: **p<0.01 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 14. Western blot analysis of interleukin-1 beta (IL-1 β) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: **p<0.01 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

8. 관절조직 내 단백질 분해 인자 분석

1) MMP-2

MMP-2 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 $\pm$ 0.08)과 비교하였을 때 대조군(1.66 $\pm$ 0.18)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.30 $\pm$ 0.19)은 유의성 있는 감소를 나타냈으며(p<0.05), 양성 대조군(0.85 $\pm$ 0.06)도 유의성 있는 감소를 나타냈다(p<0.001). CL 투여군(1.26 $\pm$ 0.07)과 CH 투여군(1.19 $\pm$ 0.07) 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다(p<0.05, p<0.01) (Fig. 15).

2) MMP-9

MMP-9 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 $\pm$ 0.21)과 비교하였을 때 대조군(1.52 $\pm$ 0.29)에서 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군(1.10 $\pm$ 0.13)은 감소하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(0.67 $\pm$ 0.06)은 유의성 있는 감소를 나타냈다(p<0.01). CL 투여군(0.98 $\pm$ 0.09)과 CH 투여군(0.91 $\pm$ 0.12)은 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다(p<0.05) (Fig. 16).

Fig. 15. Western blot analysis of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

3) TIMP2

TIMP2 단백질을 분석한 결과, 정상군(1.00 ± 0.21)과 비교하였을 때 대조군(0.68 ± 0.11)에서 단백질 발현이 감소하는 경향을 나타냈고 대조군에 비하여 NS 투여군 (0.92 ± 0.06)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 양성 대조군(1.14 ± 0.21)은 유의성 있는 증가를 나타냈다($p < 0.05$). CL 투여군 (0.88 ± 0.07)은 증가하는 경향을 나타냈으며, CH 투여군 (1.21 ± 0.21)은 유의성 있는 증가를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 17).

9. 조직병리학적 분석

1) H&E 염색

정상군은 활막 조직과 연골 조직이 정상적인 반면 대조군은 골관절염 유발로 인해 활막 조직과 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 대조군과 비교하여 양성 대조군은 활막 조직과 연골 조직의 손상이 억제됨을 관찰할 수 있었으며 CL 투여군과 CH 투여군 또한 농도 의존적으로 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되었다 (Fig. 18).

2) Safranin-O 염색

정상군은 관절 조직과 proteoglycan이 정상적으로 보였으나 대조군은 골관절염 유발로 인해 정상 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 관찰되었다. 반면 양성 대조군은 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 억제되었으며 CL 투여군과 CH 투여군 또한 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 19).

3) M-T 염색

정상군은 활막 조직과 연골 조직이 정상적인 반면 대조군은 골관절염 유발로 면역세포가 침투하여 활막 조직과 연골 조직의 심각한 손상이 나타났다. 반면 양성 대조군에서 활막 조직과 연골 조직의 손상이 억제됨을 관찰할 수 있었으며 CL 투여군과 CH 투여군은 면역세포의 침투나 활막 조직과 연골 조직의 손상이 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 20).

Fig. 16. Western blot analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 17. Western blot analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2) expression levels in the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats. All data are expressed means $\pm$ SEM, n=8 rats per group. Nor: normal rats, Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L, Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L, CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcuma Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L. Significance: * $p < 0.05$ vs. MIA-induced osteoarthritis rat by student least-significant differences test.

Fig. 18. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of CL and CH in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats (hematoxylin and eosin [H&E] staining, $\times 200$). (A) Nor: normal rats, (B) Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, (C) NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μL , (D) Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, (E) CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μL , (F) CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μL .

Fig. 19. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of CL and CH in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats (Safranin-O staining, $\times 200$). (A) Nor: normal rats, (B) Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water, (C) NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μL , (D) Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight, (E) CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μL , (F) CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μL .

Fig. 20. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of CL and CH in monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats (Masson's trichrome staining, $\times 200$). (A) Nor: normal rats. (B) Con: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with water. (C) NS: MIA-induced osteoarthritis rats injected with normal saline 100 μ L. (D) Indo: MIA-induced osteoarthritis rats orally administered with indomethacin 5 mg/kg body weight. (E) CL: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture low concentration 100 μ L. (F) CH: MIA-induced osteoarthritis rats injected with *Curcumae Longae Rhizoma* pharmacopuncture high concentration 100 μ L.

고찰»»»

골관절염(osteoarthritis)은 노화가 진행됨에 따라 뼈모세포의 분화가 감소하고 연골의 분해가 빨라져 정상적인 골격구조의 소실, 연골의 손상 및 인대가 강직되는 등의 증상이 나타나는 질환이다⁹⁾. 국민 건강통계에 의하면 무릎 부위의 골관절염 유병률은 연령이 증가할수록 높아지는 것으로 나타나, 고령화에 따른 노인 인구 증가로 골관절염 유병률과 의료비용이 상승될 것으로 예측된다¹⁰⁾.

골관절염 치료의 목적은 통증을 경감하고 신체기능 손실을 최소화하는 것이다¹¹⁾. 수술적 치료 외에 통증이 있는 관절에 부하가 걸리는 것을 감소시키는 비약물적 치료와 비스테로이드 항염 진통제, COX-2 길항제 등의 약물로 통증을 완화시키는 보조적인 치료 방법이 있다. 하지만 약물 요법은 근본적인 치료 방법이 아니며 장기 복용 시 위장관계 출혈, 신 독성, 고혈압, 심혈관계 질환 등의 부작용이 나타날 수 있다^{12,13)}.

한의학에서의 골관절염은 痺症, 歷節風, 鶴膝風 등의 범주에 속하며, 원인으로는 營衛失調, 腠理空疎, 正氣虛

弱하여 발생하거나 風寒濕의 三氣가 침범하여 氣血의 운행을 방해하고 經絡의 흐름을 막아서 발생한다고 본다. 이로 인해 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 부자연스러워지는 등의 증상이 발생한다¹⁾. 치료는 변증에 따라 補肝腎, 強筋骨, 祛風濕, 活血祛瘀 등의 치료법을 활용하고, 經脈과 氣血을 調和시키는 방법으로 치료한다¹⁴⁾.

약침요법은 經絡理論을 근간으로 하는 鍼灸療法과 氣味論을 근간으로 하는 藥物療法이 결합된 치료법으로, 한약을 정제, 추출하여 만든 약침액을 혈위에 주입함으로써 자침과 약물의 효과를 동시에 낼 수 있는 치료 방법⁴⁾이다. 최근 골관절염의 치료에 있어 봉독과 鹿茸 약침에 대한 연구¹⁵⁾, 附子 약침에 대한 연구¹⁶⁾, 仙茅 약침에 대한 연구¹⁷⁾ 등이 보고되어 있다.

薑黃은 생강과에 속한 다년생 本草인 *Curcumae Longae Rhizoma*의 근경을 건조한 것으로 破血行氣, 通經止痛의 효능으로 風濕痺痛과 關節不利 등의 증에 상용된다⁸⁾. 薑黃의 주요 성분인 curcumin의 효능은 여러 선행 연구에서 밝혀져 있다. Curcumin은 bilirubin 수치를 저하시키고

간 보호 효능을 나타내며¹⁸⁾, 위장에서 H₂ 수용체에 길항 작용을 할 뿐만 아니라¹⁹⁾ 항염증 및 항산화 작용을 나타내었다²⁰⁾. 또한 薑黃 추출물은 염증성 cytokine의 유리를 억제하여 관절염에 효과가 있었으며²¹⁾, 무릎 관절염 환자들의 임상실험에서도 효능이 입증되었다²²⁾. 또 다른 임상 실험에서는 non-steroidal anti-inflammatory drugs의 일종인 diclofenac과 비교시험을 하였는데, diclofenac보다 뛰어난 효과를 보이지는 못했으나, diclofenac의 보조요법으로 curcumin을 투여했을 때 통증완화 효과가 증가되는 것으로 나타났다²³⁾.

본 연구에서 사용한 MIA는 관절강에 주입하게 되면 관절 연골의 변성과 괴사가 진행되는데, 연골 손상과 기능 장애, 통증 양상이 사람의 골관절염과 유사하게 발현되어 골관절염과 관련된 많은 연구에 응용되고 있다^{24,25)}. MIA 주입 후 3일째부터 무릎 관절 연골에서 급성 염증 반응에 의한 통증 유발 물질이 관절 내에 분비되어 통증이 발생되고 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 7일째부터는 활막 조직에 변형이 발생하며 proteoglycan의 소실이 모든 구획에서 관찰되고, 21일째부터 심층부 연골까지 파괴되는 것을 관찰할 수 있었다^{26,27)}.

薑黃 약침의 안정성을 확인하기 위하여 체중 및 식이섭취량의 변화를 측정하고, 혈청 ALT와 AST를 측정하였다. MIA 투여 후 2주간 모든 군에서 체중이 증가하였으며 각 군들 사이에 유의성은 없었고 식이섭취량에도 유의성은 없었다(Table I). ALT와 AST는 CL 투여군에서 감소하는 경향이 나타났고, CH 투여군에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1, 2). 위와 같은 결과로 보아 薑黃 약침은 안정성이 있다고 생각된다.

본 연구에서 사용된 뒷다리 체중 부하 검사는 관절염이 유발된 쪽의 다리에 체중을 싣지 않으려는 특성을 이용하여 체중 부하 정도를 측정하는 검사로, 이 검사를 통하여 통증을 정량적이고 객관적으로 측정할 수 있다^{26,28)}. CL 투여군과 CH 투여군 모두에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소를 나타내었으므로(Table II) 薑黃 약침은 관절염이 유발된 관절의 통증을 감소시키는 효과가 있었다.

활성산소종(ROS)이란 산소분자의 전자가 쌍을 이루지 못하여 불안정한 상태인 변형된 산소를 의미하며, 그 종류로는 hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (-OH), superoxide anion (O₂⁻), 그리고 hypochlorous acid (HClO)

등이 있다. 이 중 superoxide anion은 염증성 관절 질환에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²⁹⁾. ROS는 자체로도 산화적 스트레스로 작용하지만 다른 ROS와의 이차적인 산화 환원반응을 통해서도 세포에 직접적인 영향을 미치거나 신호전달 과정에 관여한다. 이러한 과정 중에 신체의 항산화능력이 떨어지거나 균형이 깨어지면 산화적 스트레스를 유발하게 되고³⁰⁾, cytokine이나 prostaglandin 같은 염증 전구물질이 ROS와 함께 염증 부위에서 유리된다³¹⁾. 본 연구에서 혈청 ROS는 CL 투여군과 CH 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였으므로(Fig. 3) 薑黃 약침은 활성산소종의 생성을 억제하는 효과가 있었다.

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase는 세포막 단백질로 superoxide, hydroxy peroxide와 같은 ROS를 생성한다³²⁾. NOX는 gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} 및 p40^{phox}의 다섯 개의 단백질로 구성되어 있고 평소에는 떨어져 있다가 세포가 자극을 받고 활성화되면 p47^{phox}가 인산화되어 세포막 단백질 p22^{phox}와 결합되면 활성화되면서 superoxide anion을 생성한다^{33,34)}. NOX4는 주로 신장에 많이 분포되어 있지만 신체조직 전반에서 관찰되며, 분포 부위에 따른 특징적인 기능성은 없는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. NOX4는 p22^{phox}의 조절에 의해 활성화되며, NOX1, NOX2, NOX5 등이 superoxide anion을 생성하는 것과 달리 NOX4는 superoxide anion에 전자를 운반하여 주로 hydrogen peroxide를 생성하는 것으로 밝혀졌다³⁶⁾. 본 실험에서 관절조직의 NOX4와 p47^{phox} 단백질을 분석한 결과, CL 투여군과 CH 투여군에서 모두 감소하는 경향을 보였으며, 특히 CH 투여군에서 유의성 있게 감소하였으므로(Fig. 4, 5) 薑黃 약침은 관절조직 내에서 산화적 스트레스 매개 인자를 조절하는 항산화 효과가 있었다.

Nrf2는 염증조절인자의 일종으로 염증 반응이나 산화적 스트레스와 같은 병리적 상황에서 증가하며, 다양한 항산화전자의 전사를 일으켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 알려졌다^{37,38)}. GPx는 세포와 혈중에 존재하며, 체내에서 생성된 hydrogen peroxide와 기타 유리 과산화물을 분해하여 세포를 보호하는 항산화효소이다³⁹⁾. Catalase 또한 과산화수소를 분해하여 세포 내의 소기관 손상을 막는다고 알려져 있다⁴⁰⁾. Heme oxygenase는 HO-1, HO-2, HO-3가 있는데, 그중 HO-1은 특히 스트레스에 반응하여 발현되는 효소로 강력한 항산화,

항염증 효과와 더불어 세포보호 효과가 있다고 알려져 있다⁴¹⁾. 본 연구에서 Nrf2는 CL 투여군과 CH 투여군에서 모두 증가하였으며, 특히 CL 투여군에서 유의성 있게 증가하는 결과가 나타났다. GPx와 Catalase CL 투여군과 CH 투여군에서 모두 유의성 있게 증가하였으며, HO-1 역시 CL 투여군과 CH 투여군에서 모두 증가하는 것으로 나타났다, 특히 CH 투여군에서는 유의성 있게 증가했으므로 (Fig. 6-9) 薑黃 약침은 관절 조직 내에서 항산화 단백질을 증가시켰다.

NF- κ Bp65는 정상 상태에서는 세포질에서 inhibitory kappa B (I- κ B)와 결합하여 불활성 상태로 존재하다가 외부자극에 의해 I- κ B가 분해되면서 NF- κ B는 핵 안으로 이동하게 되고^{42,43)} TNF- α , IL-6, IL-8와 같은 물질에 결합하여 receptor의 발현을 촉진한다^{44,45)}. COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘며, COX-1은 혈관, 위장관계, 신장 등의 거의 모든 조직에 존재하며 prostaglandin의 생성과 다양한 생리적 효과와도 관련되어 있다. COX-2는 주로 염증 부에 존재하며 endotoxin과 mitogen, cytokine 등과 같은 염증 전구물질들에 의해 합성된다. 뇌, 신장, 난소, 자궁, 뼈, 연골, 혈관 내피세포 등에 존재하여, cytokine에 의해 염증 반응에서 나타난다⁴⁶⁾. NO를 소량 생성하는 cNOS와는 달리 iNOS는 세포 내에서 항상 존재하며, 염증 등의 자극에 의해 과량의 NO를 생성하고, 과량으로 생성된 NO는 TNF- α , IL-1 및 IL-6 등 염증 cytokine 뿐만 아니라 COX-2도 과량 생산하여 과도한 면역반응을 야기한다⁴⁷⁾. 과량 생산된 NO는 염증과 조직 손상에 관련되어 있고, 관절염 실험 모델에서 NO의 합성과 활성을 조절하여 관절염 병태를 개선시킬 수 있다고 알려졌다⁴⁸⁾. 염증성 cytokine인 IL-1 β 와 TNF- α 는 전염증성 cytokine으로 골관절염의 염증성 활막에서 과량으로 분비되어 proteoglycan의 합성을 저해하고 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴⁹⁾. 본 연구에서 관절조직 내의 염증 cytokine을 분석한 결과, NF- κ Bp65와 COX-2에서 CL 투여군과 CH 투여군 모두 감소하는 경향이 있었으며 특히 CH 투여군에서는 COX-2가 유의성 있게 감소하였다. iNOS, TNF- α , IL-1 β 또한 CL 투여군과 CH 투여군에서 모두 감소하는 경향이 있었으며 CL 투여군은 IL-1 β 가 유의성 있게 감소하였고, CH 투여군에서 iNOS와 IL-1 β 를 유의성 있게 감소시켰으므로 (Fig. 10-14) 薑黃 약침은 관절조직에서 염증성 cytokine 분비를 억제시키고 염증매개 인자들의 생성을 조절

하여 항염증 효과가 있었다.

MMPs는 기질단백분해효소로 소아, 유년, 청장년기에는 생명 현상 유지에 필수적인 조절 단백질이지만, 노인에서는 MMPs가 정상보다 과잉 발현하여 염증세포의 침윤과 섬유화, 종양 등의 병리적 상황으로 진행하게 된다⁵⁰⁾. 이 중 MMP-2와 MMP-9은 제IV형 콜라겐을 분해하는 단백질⁵¹⁾로 골관절염에서는 proteoglycan의 분해와 관련 있어⁵²⁾, MMPs의 활성을 조절하는 것이 관절염 치료에서 중요하다고 알려져 있다⁵³⁾. TIMPs는 MMPs에 길항작용을 하며 이들의 상호작용에 의해서 MMP의 분비를 제어하고 활성도를 조절하는 것으로 알려져 있다⁵⁴⁾. 본 연구에서 관절조직 내의 단백질 분해인자 MMP-2, MMP-9, TIMP2를 분석한 결과 CL 투여군과 CH 투여군 모두에서 MMP-2와 MMP-9의 유의성 있는 감소가 있었으며, TIMP2는 CH 투여군에서 유의성 있는 증가를 나타내었고 CL 투여군에서 유의성은 없었지만 증가하는 경향이 있었으므로 (Fig. 15-17) 薑黃 약침은 MMPs의 활성을 조절하여 단백질 분해를 억제하였다.

정상적인 관절연골에서 proteoglycan은 관절연골의 세포의 기질을 이루는 주성분으로 정상 연골 세포에 의해 지속적으로 생산되는 동시에 연골 세포에서 MMPs를 분비하여 proteoglycan을 파괴함으로 관절 내에서 균형을 이루게 된다⁵⁵⁾. 관절 내 proteoglycan 함량이 감소하게 되면 관절연골의 불안정성이 높아져 골관절염의 진행이 시작될 수 있다고 알려져 있다⁵⁶⁾.

본 연구에서는 H&E, Safranin-O 및 M-T 염색을 통하여 조직학적 변화를 관찰하였다. 그 결과 대조군에서는 골관절염 유발로 인하여 활막조직과 연골조직의 손상이 관찰되었고, proteoglycan의 파괴가 관찰되었다. 반면 CL 투여군과 CH 투여군에서는 농도의존적으로 활막과 연골의 손상이 억제되어 있었으며, proteoglycan의 파괴가 억제되어 있는 점을 관찰할 수 있었으므로 (Fig. 18-20) 薑黃 약침은 관절조직의 파괴를 억제하고 연골을 보호하는 효과가 있었다.

이상으로 薑黃 약침을 MIA로 유도된 골관절염 흰쥐에 주입하여 미치는 영향을 살펴본 결과, 관절조직에서 활성 산소종을 억제하고 항산화 단백질을 생성하여 항산화 효과를 나타내었으며, 염증성 cytokine 분비를 억제시키고 동시에 염증매개 인자들의 생성을 조절하여 항염증 효과가 있었고, 관절 조직을 보호하고 골관절염의 진행을 억제시

키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 향후 薑黃 약침의 안정성 및 작용기전에 대한 추가적인 연구가 진행된다면 임상에서 골관절염의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론»»»»

薑黃 약침이 골관절염에 미치는 영향을 확인하기 위해 MIA로 유도된 골관절염 흰쥐를 사용하여 체중 변화 및 식이 변화, 뒷다리 체중부하, 간기능 검사, 산화적 스트레스 관련인자, 산화적 스트레스 매개 인자, 항산화 단백질, 염증성 cytokine 및 매개인자, 단백질 분해 인자 및 조직병리학적 변화를 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뒷다리 체중부하 검사에서 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였다.
2. 간독성은 나타나지 않았고, ALT와 AST가 유의성 있게 감소하였다.
3. 산화적 스트레스의 바이오마커인 ROS가 유의성 있게 감소하였다.
4. GPx와 Catalase는 농도의존적으로 유의성 있게 증가하였다.
5. COX-2, iNOS, IL-1 β , NOX4 p47^{phox}는 유의성 있게 감소하였다.
6. MMP-2, MMP-9은 유의성 있게 감소하였고, TIMP2는 유의성 있게 증가하였다.
7. 병리조직학적 검사에서 활막의 연골의 손상 정도가 억제되었고, proteoglycan의 파괴도 억제되었다.

이상의 결과로 보아 薑黃 약침은 항산화, 항염증 및 진통 효과를 나타내고, 골관절염 진행을 억제시키며 연골을 보호하는 효능이 있으므로 향후 이와 관련된 추가 연구가 진행된다면 골관절염에도 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

References»»»»

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation, Korea Rehabilitation Medicine, 4th ed, Paju:Koonja Publishing, 2015:102-16.
2. The Korean Orthopaedic Association, Orthopaedics, 7th ed, Seoul:Choisin medical Publishing Co, 2013:49-50, 99-100, 317-26.

3. Jung IC, Kim ES, Lee EJ, Gu JH, Park YC. A systematic review of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis. J Korean Med Rehabil, 2017;27(3):47-60.
4. Science Committee of Korean Pharmacopuncture Institute, Pharmacopuncture Medicine Laboratory, Pharmacopunctureology, Seoul:Elsevier Korea, 2011:3-8.
5. A Herbal Medicine Compilation Committee of a College of Korean Medicine, Herbal medicine, 3th ed, Seoul: Yeonglimsa, 2014:454-6.
6. Yoon JH, Ryu BH, Kim JS, Yoon SH, Effects of Curcuma longa L. on some kinds of cancer cells, The Journal of Internal Korean Medicine, 2006;27(2):429-43.
7. Jung SY, Oh MS, Ju MS, Oh HI, Park HB, Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between Curcumae Longae Radix and Curcumae Longae Rhizoma, Korea Journal of Herbology, 2010;25(1):83-91.
8. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, Free Radic Biol Med, 1994;16(2):149-56.
9. Shane Anderson A, Loeser RF, Why is osteoarthritis an age related disease? Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010; 24(1):15-26.
10. Ministry of Health and Welfare, Korea Health Statistics 2012: Korea National Health and Nutrition Examination Survey [Internet] 2013 [cited 2017 Oct 11]. Available from: URL: https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7.
11. Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed, Seoul:Doseochulpah MIP, 2010:2594-603.
12. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G, Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs, N Engl J Med, 1999;340(24):1888-99.
13. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ, Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors, J Am Med Assoc, 2001;286(8):954-9.
14. Textbook Committee of Korean Acupuncture and Moxibustion Society, Acupuncture Medicine, 4th ed, Seoul: Hanmi Medical Publishing Co, 2016:550.
15. Kim WY, Choi JB, Effects of bee venom and Cervi Cornu Parvum pharmacoacupuncture in monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritis rat, J Korean Med Rehabil, 2010;20(1):61-77.
16. Kim YH, Yim YK, Lee H, The effects of herbal-acupuncture with Aconiti lateralis preparata Radix solution on collagen-induced arthritis, Korean J Acupunct, 2006;23(2):137-54.
17. Lee HJ, Kim JS, Lim SC, Lee YK, Ji MJ, Original article: effects of Curculiginis rhizoma pharmaco-acupuncture at ST36 on monosodium iodoacetate(MIA)-induced osteoarthritic rats, Journal of Acupuncture Research, 2015;32(1): 53-66.
18. Deshpande UR, Gadre SG, Raste AS, Pillai D, Bhide SV,

- Samuel AM. Protective effect of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1998; 36(6):573-7.
19. Kim DC, Kim SH, Choi BH, Baek NI, Kim D, Kim MJ, Kim KT. *Curcuma longa* extract protects against gastric ulcers by blocking H2 histamine receptors. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(12):2220-4.
20. Yadav SK, Sah AK, Jha RK, Sah P, Shah DK. Turmeric (curcumin) remedies gastroprotective action. *Pharmacogn Rev*. 2013;7(13):42-6.
21. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Kuscuglu N, Wilson J, McCaffrey G, Stafford G, Chen G, Lantz RC, Jolad SD, S ólyom AM, Kiela PR, Timmermann BN. Efficacy and mechanism of action of turmeric supplements in the treatment of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(11):3452-64.
22. Madhu K, Chanda K, Saji MJ. Safety and efficacy of *Curcuma longa* extract in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology*. 2013;21(2):129-36.
23. Pinsornsak P, Niempoog S. The efficacy of *Curcuma Longa* L. extract as an adjuvant therapy in primary knee osteoarthritis: a randomized control trial. *J Med Assoc Thai*. 2012;95 Suppl 1:S51-8.
24. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2004; 370(2-3):236-40.
25. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic change of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol*. 2003;31(6):619-24.
26. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(11):821-30.
27. 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(2):184-8.
28. Zhu CZ, Hsieh G, Ei-Kouhen O, Wilson SG, Mikusa JP, Hollingsworth PR, Chang R, Moreland RB, Brioni J, Decker MW, Honore P. Role of central and peripheral mGluR5 receptors in post-operative pain in rats. *Pain*. 2005;114(1-2):195-202.
29. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(8):643-54.
30. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.
31. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(10):747-55.
32. Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13304-13.
33. Hultqvist M, Olsson LM, Gelderman KA, Holmdahl R. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol*. 2009;30(5):201-8.
34. Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3001-5.
35. Kallenborn-Gerhardt W, Schröder K, Geisslinger G, Schmidt A. NOXious signaling in pain processing. *Pharmacol Ther*. 2013;137(3):309-17.
36. Altenhöfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans JJ, Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt HH. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(14):2327-43.
37. Jin BM, Lee MK, Lee JS, Hyun KY. Anti-inflammatory effects of Korean red ginseng extract in formalin-induced orofacial pain in rats. *J Korea Acad Industr Coop Soc*. 2014;15(9):5708-15.
38. Lim JS, Ahn KY. Potassium depletion upregulates expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol*. 2011;30(3):239-45.
39. Rotruck JT, Pope A, Ganther ME, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073):588-90.
40. Preiser JC. "Oxidative stress". *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2012;36(2):147-54.
41. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, Van Den Engel S, Mol WM, Weimar W, Baan CC. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3278-87.
42. Beg AA, Baldwin AS Jr. The I kappa B protein: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factor. *Genes Dev*. 1993;7(11):2064-70.
43. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-κ B1 precursor protein and the activation of NF-κB. *Cell*. 1996;78(5):773-85.
44. Kuprsh DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SAC. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene:

- distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene*. 1995;11(1):97-106.
45. Galien R, Evans HF, Garcia T. Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-kappa B binding site in interleukin-6 promoter inhibition by estrogens. *Mol Endocrinol*. 1996;10(6):713-22.
 46. Brune K, Hinz B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol*. 2004; 33(1):1-6.
 47. Richardot P, Charni-Ben Tabassi N, Toh L, Marotte H, Bay-Jensen AC, Miossec P, Garnero P. Nitrated type III collagen as a biological marker of nitric oxide-mediated synovial tissue metabolism in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(10):1362-7.
 48. McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J Immunol*. 2001;166(4): 2734-40.
 49. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. Crucial role of interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):754-63.
 50. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implication. *J Clin Oncol*. 2000;18(5):1135-49.
 51. Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1999;20(5):749-55.
 52. Nagasa H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.
 53. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity. *Oral Dis*. 2000;6(3):137.
 54. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3): 187-98.
 55. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(8): 924-9.
 56. Shinomura T. Proteoglycan knock-out mice and osteoarthritis. *Clin Calcium*. 2004;14(7):58-63.