知栢地黃湯의 골관절염 Rat 모델에 대한 항산화, 항염증 효과

우창윤 · 김영준 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Antioxidative, Anti-inflammatory Effects of *Jibaekjihwang-tang* (*zhibaidihuang-tang*) on Osteoarthritic Rat Model

Chang-Yun Woo, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

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

RECEIVED March 17, 2020
REVISED March 31, 2020
ACCEPTED April 6, 2020

CORRESPONDING TO

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

TEL (054) 271-8006
FAX (054) 281-7463
E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study intended to evaluate antioxidative, anti-inflammatory effects of *Jibaekjihwang-tang* on monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritic rat model and investigate the potential mechanism.

Methods *Jibaekjihwang-tang* (100 or 200 mg/kg body weight) was orally administered once daily for 2 weeks days from day 7 after intra-articular MIA injection. And blood analysis, the histologic examinations were performed. Moreover, protein expressions related to anti-oxidant and cartilage degradation and anti-inflammatory cytokines were measured by western blot analysis in cartilaginous tissue.

Results *Jibaekjihwang-tang* reduced serum inflammatory cytokines such as tumor necrosis factors- α and interleukin-6. Furthermore, the increase of anti-oxidant enzymes reversed the oxidative stress caused by MIA. Meanwhile, *Jibaekjihwang-tang* suppressed MIA-induced inflammation and cartilage degradation in cartilaginous tissue.

Conclusions *Jibaekjihwang-tang* alleviated MIA-induced inflammation. *Jibaekjihwang-tang* was associated with a protective effect on cartilage and by reducing inflammation and cartilage degradation. These findings provide new approaches for understanding osteoarthritis therapy. (**J Korean Med Rehabil 2020;30(2):1-18**)

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

서론»»»»

골관절염(osteoarthritis)은 관절의 정상적인 조직의 손상으로 통증과 관절면의 운동 기능 손실이 나타나는 질환으로, 진행되면 주변 연부조직의 손상으로 이어져 관절의 불안정성이 나타나게 된다. 임상 증상으로 통증이 가장 흔하게 동반되며 관절 기능이 점차 소실된다¹⁾.

골관절염은 한의학적으로 痺病證의 범주에 속한다. 痺症은 風寒濕熱의 邪氣가 經絡으로 침입하여 關節에 응

체, 血氣運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 關節에 疼痛, 腫脹, 麻木, 重着, 屈伸不利, 심하면 강직성 변형을 초래한다²⁾. 한의학에서 골관절염 연구는 침구, 약물, 약침, 물리요법 등 다방면으로 이루어지고 있으며, 그 효과는 연골 세포의 재생과 연골 조직 보호, 진통 및 관절 가동범위 개선 등이 있다고 보고되고 있다³⁾. 특히 淸熱瀉濕湯, 搜風丸 및 搜風丸加蘇木, 靈仙除痛飲, 三氣飲, 大防風湯 등 한약처방을 이용한 연구가 다수 있지만 知栢地黃湯에 대한 연구는 없는 실정이다.

六味地黃湯은 陰虛火動, 下焦濕熱 등에 응용되는 처방인데 여기에 虛火를 내려주는 知母, 黃柏을 가미한 처방이 知柏地黃湯으로 《醫宗金鑑》⁴⁾에 처음 수록되었다. 六味地黃湯과 이를 구성하는 약재들의 항염증에 대한 효과가 보고되었고⁵⁾ 知母의 항염증 효과⁶⁾, 黃柏약침의 관절염에 대한 효과⁷⁾가 증명되어 이 약재들로 구성된 知柏地黃湯도 이와 같은 효과를 가졌을 것으로 기대되어 이 연구를 시작하게 되었다.

이에 저자는 먼저 知柏地黃湯이 *in vitro*로 항산화, 세포 독성 및 항염증에 미치는 영향을 확인하고, monosodium iodoacetate (MIA)로 골관절염을 유발한 rat에 知柏地黃湯 추출물을 투여한 후 뒷다리 체중 부하 검사, 지질과산화 분석을 하고 관절 조직의 항산화, 항염증 관련 단백질, 염증성 cytokine, 단백질 분해인자를 분석하고 연골의 병리조직학적 검사를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법 >>>>

1. 재료

1) 시약

본 실험에서 사용되어진 diethylene glycol, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium hydroxide, sodium carbonate, Insulin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, naringin, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), MIA, dithiothreitol (DTT)은 Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용했다. 1차 항체 rabbit polyclonal antibodies against p22^{phox}, p47^{phox}, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), catalase, phospho-p38 (p-p38)와 goat polyclonal antibodies against interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α)와 mouse monoclonal antibodies against nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65), inducible nitric oxide synthase (iNOS), phosphorylated inhibitor of κ B α (p-I κ B α), cyclooxygenase 2 (COX-2), tissue inhibitor matrix metal-

loproteinase 1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), β -actin, histone 그리고 2차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입했다. 또한, rabbit polyclonal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX4)는 LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, USA)에서 구입했다. 그리고 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), protease inhibitor cocktail은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입했으며, nitrocellulose membranes, ECL western blotting detection reagents는 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. 단백질의 정량을 위해서 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. RAW264.7 cells은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 공급받았다. Fetal bovine serum (FBS)과 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Hyclone Co. (Logan, UT, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), hydrogen peroxide (H₂O₂), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), trypsin-EDTA, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용했다.

2) 동물

동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 제공받은 7주령의 웅성 Sprague-Dawley rat으로 무게 200~250 g이며 실험에 들어가는 당일까지 고형 사료와 물을 자유롭게 공급받았다. 온도(23 $\pm$ 2°C)와 습도(50 $\pm$ 5%)가 유지되는 사육실에서 12시간 명암조절 환경에서 일주일간 적응된 후 실험에 투입되었다. 이 실험은 대구한의대학교 소속 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: DHU2019-096)을 받아 진행하였다.

3) 약재 및 시료추출

약재들은 『東醫方劑와 處方解説』⁸⁾에 의거하여 옹기 한약국(Daegu, Korea)에서 구입, 정선 후 사용하였으며 1첩 당 분량은 Table I과 같다. 知柏地黃湯 약재 116 g 분량에 증류수 1,160 mL를 가하여 열탕 추출기에서 2 시간 가열 추출하여 얻은 추출액을 여과지로 여과한 후 감압 농축기로(온도 50°C) 감압 농축하였다. 그 다음 동

Table I. Composition and Amount of *Jibaekjihwang-tang*

Pharmacognostic name	Amount (g)
<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	16
<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8
<i>Corni Fructus</i>	8
<i>Poria (Hoelen)</i>	6
<i>Moutan Cortex</i>	6
<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	4
<i>Phellodendri Cortex</i>	4
Total amount	58

결 건조기를 이용하여 완전 건조한 知栢地黄湯 분말 (JBHT) 15.95 g을 얻었으며 수득률은 13.75%였다. 이때 얻은 知栢地黄湯 분말은 -80°C에서 냉동보관하였다가 실험 직전 녹여서 사용하였다.

4) 실험기기

기기는 대웅 열탕 추출기(DWT-1800T; Daewoong Bio, Hwaseong, Korea), vortex mixer, 회전식 증발 농축기 (Buchi B-480; Flawil, Switzerland), 냉장 고속 원심분리기(Mega17R; Hanil Science Co., Ltd., Daejeon, Korea), 동결건조기(FD5508; Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea), 전자저울(Cas, Yangju, Korea), incapitance tester (Ser No. 01/45/25; Linton instrument Co., Palgrave, UK), tissue grinder (Bio Spec Product, Bartlesville, OK, USA), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH 라디칼 소거능 측정

추출한 知栢地黄湯의 free radical 소거능 분석을 위해 DPPH free radical 소거법을 활용하였다⁹⁾. 0.2 mM DPPH 용액(100 μ L)과 知栢地黄湯을 농도별로 잘 희석한 용액 (100 μ L)을 혼합하여 37°C에서 30분간 실온의 암소에 두었다가 흡광도 540 nm에서 측정하였으며, L-ascorbic acid는 양성대조군으로 본 실험에 사용하였다. 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

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

$$= \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않은 경우 흡광도

OD_{sample}: 시료가 들어간 경우 흡광도

2) ABTS 라디칼 소거능 측정

추출한 知栢地黄湯의 항산화 효능을 평가하기 위해 ABTS free radical 소거능을 활용하였다¹⁰⁾. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 잘 혼합하여 실온의 암소에 두었다가 약 16시간 이상 방치 후 ABTS+을 형성시킨 후 흡광도 415 nm에서 0.70±0.02가 되게 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액(95 μ L)에 知栢地黄湯 5 μ L를 가하여 15분간 방치한 후 흡광도를 측정하였으며, L-ascorbic acid는 양성대조군으로 본 실험에 사용하였다. 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

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

$$= \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

OD_{control}: 시료가 들어가지 않은 경우 흡광도

OD_{sample}: 시료가 들어간 경우 흡광도

3) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법¹¹⁾을 사용하여 측정하였다. 知栢地黄湯 시료 10 μ L (100 mg/mL)에 증류수 790 μ L와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ L를 넣어 잘 혼합하여 1분간(실온) 반응시킨다. 그 후, 20% sodium carbonate 150 μ L를 더하여 2시간 반응하게 한 후 Infinite M200 UV 분광광도계(Tecan, Grodig, Austria)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 이용하여 표준검량선을 구하였으며, 知栢地黄湯의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다. 플라보노이드 함량은 Lister 등¹²⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 추출한 知栢地黄湯 시료 100 μ L (11.1 mg/mL)에 1 N NaOH 10 μ L와 diethylene glycol 1 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 차광시킨 후 UV 분광광도계로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 naringin을 이용하여 표준검량선을 구하였으며 知栢地黄湯의 플라보노이드 함량을 산출하였다.

4) 세포배양

RAW264.7 대식세포는 American type culture collection (ATCC, Manassas, VI, USA)에서 분양받아 DMEM 배지에 streptomycin (100 μ g/mL)과 penicillin (100 U/mL)을 10% FBS에 첨가하여 37°C, 5% CO₂로 조절되는 HERAcell 150 (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA)에서 배양시켰다.

5) MTT assay에 의한 세포생존율 측정

知栢地黄湯의 세포생존율을 평가하기 위해 MTT 분석법을 사용하여 측정했다. 96-well plate에 5×10^4 cells/well의 Raw264.7 대식세포로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 세균배양기에서 24시간 동안 배양시킨 후 상등액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 씻어낸 다음 DMEM 배지에 知栢地黄湯을 농도별로 처리 후 37°C, 5% CO₂를 이용하여 배양시켰다. 그 후 DMEM 배양액을 제거하였으며 MTT solution 20 μ L (5 mg/mL)와 PBS 180 μ L를 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 세균배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 상등액을 제거했으며 그 다음 DMSO 200 μ L씩을 추가하여 생성된 formazan을 용해하였다. 이를 ELISA reader를 사용하여 550 nm에서 측정하였다. 세포생존율(%)은 아래 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = (\text{시료를 처리한 군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

6) Nitric oxide (NO) 생성 억제율 분석

Raw264.7 cell 2.5×10^5 cells/well을 96-well plate에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 세균배양기에서 배양시켰다. 분주한 세포에 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/mL를 처리한 후 정해진 농도의 知栢地黄湯 시료를 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 그 후 배지에서 분비되는 NO를 Griess reaction에 기초한 NO colorimetric assay (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)로 분석했다. 세포로부터 생산된 NO는 sodium nitrate를 이용하여 표준곡선을 그린 후 NO 함량을 분석하였다.

7) Cytokines의 ELISA 분석

Raw264.7 cell을 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 10% FBS와 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하면서 동시에 知栢地黄湯 농도를 달리하여(10, 50, 100, 200, 400 및 800 μ g/mL) 처리하였다. 24시간 같이 배양시킨 뒤, IL-6, interferon-gamma (IFN- γ), IL-1 β 및 TNF- α 를 분석용 ELISA법으로 실험하였다. 즉, anti-mouse IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 를 96-well plate에 1 μ g/mL 농도로 코팅하여 4°C에서 12시간 방치하였다. 코팅시킨 다음, 비특이적 결합 부위를 방지하기 위해 PBS (2% BSA 포함)에 blocking buffer를 추가하여 37°C에서 2시간 동안 유지시켰다. PBS (0.05% tween-20 포함)로 4회 씻어낸 후 표준액과 知栢地黄湯(50, 100, 250 및 500 μ g/mL)을 처리한 배양 상등액을 100 μ L씩 각 well에 추가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. PBS (0.05% tween-20 포함)로 4회 씻은 후 anti-mouse TNF- α , biotinylated IFN- γ , anti-mouse IL-6, anti-mouse IL-1 β 는 PBS (1% BSA 포함)를 사용하여 0.05 μ g/mL로 희석 후 well에 처리하여 37°C 2시간 동안 방치한다. 세정용 완충용액을 이용하여 7회 세척한 다음 avidin-conjugated enzyme 2.5 μ g/mL의 농도로 well에 처리 후 37°C 30분 방치한 다음 7회 씻어냈다. ABTS 기질액은 각 well에 100 μ L를 넣어 10분간 발색을 유도한 후 ELISA reader를 사용하여 450 nm 파장에서 IL-1 β , IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 의 함량을 분석하였다.

8) 약물투여와 실험군 분리

실험군은 아무런 처치를 하지 않은 정상군(Normal), MIA로 골관절염 유도 후 증류수를 경구 투여한 대조군(Control), MIA로 골관절염 유도 후 indomethacin 5 mg/kg 투여군(Indo), MIA로 골관절염 유도 후 JBJHT 100 mg/kg 투여군(JBJHT100), MIA로 골관절염 유도 후 JBJHT 200 mg/kg 투여군(JBJHT200) 등 총 5군으로 분리하였으며, 각 군당 7마리씩 배속시켰다. indomethacin과 JBJHT를 증류수에 녹여 매일 오전 일정한 시간에 2주간 경구 투여하였다.

9) MIA에 의한 골관절염 유발

마취제 zoletile mixture 3.5 mg/kg을 복강에 주사하여

쥐를 마취시키고, 오른쪽 무릎 관절낭 주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유도 물질인 MIA를 insulin 주사기 (BD 31 G, Ultra-Fine II; BD Medical-Diabetes Care, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 우측 무릎 관절강 안에 50 μ L (80 mg/mL) 투여하였다. MIA 주사 일주일 후에 골관절염 유발 여부를 육안으로 확인한 후 골관절염이 유발된 쥐만을 선별하여 사용하였다.

10) 지질과산화 측정

혈청 지질과산화(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)는 Mihara와 Uchiyama의 방법을 이용하여 분석하였다¹³⁾. 복대정맥에서 뽑은 혈액은 4,000 rpm으로 10분 원심분리해서 혈청을 채취하였다. 흡광도는 UV 분광광도계 Infinite M200을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 분석하였다.

11) 단백질 발현량 분석

단백질 분석을 위한 관절 조직의 세포질을 획득하기 위해 2 mM $MgCl_2$, 1.5 M sucrose, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM $CaCl_2$ 그 다음 protease inhibitor와 0.1 M DTT를 추가한 후 tissue grinder에 buffer A와 함께 조직을 분쇄한 후 NP-40 (10%) 용액을 추가하였다. 얼음 위에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm으로 2분정도 원심분리하여 상층액(세포질 포함)을 분리하였다. 핵을 획득하기 위해 NP-40 (10%)가 추가된 buffer A에 2회 잘 씻어내고 buffer C 100 μ L (50 mM HEPES, 10% glycerol, 50 mM KCl, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA 및 0.3 mM NaCl)를 추가해 다시 부유시킨 뒤 10분 간격으로 vortex을 3회 실시하였다. 12,000 rpm (4°C) 상태로 10분 간격으로 원심 분리한 후 상층액(핵 포함)을 얻어 -80°C에서 세포질과 핵을 냉동 보관하였다. 관절 조직의 세포질 β -actin, NOX4, p22phox, p47phox, p-p38, SOD, catalase, GPx-1/2, p-IkB α , COX-2, TNF- α , iNOS, MMP-1, MMP-3, TIMP-1, IL-6, IL-1 β 및 핵의 histone, NF- κ Bp65 단백질 발현을 평가하기 위해 10 μ g의 단백질을 전기 연동하여 acrylamide 겔에서 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 전기 연동된 membrane에 보고자하는 1차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight시켰으며, 그 후 PBS-T로 8분마다 6회 행구고, 1차 항체에 적합한 2차 항체(PBS-T

로 1:5000으로 희석)를 이용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 PBS-T로 8분마다 5회 세척하였다. 그리고 ECL solution (GE Healthcare)에 노출시키고 나서 Sensi-Q2000 Chemidoc로 감광시킨 후 해당 단백질 발현을 확인하고 발현된 band는 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다. 각 그룹의 단백질 수준은 정상군의 단백질 수준으로 나누어 상대적 비로 나타내었다.

12) 병리조직 분석

부검 후 오른쪽 관절조직 부위를 절단하여 10% 포르말린 용액에 넣어 연골을 탈회시켰다. Radiographic technique을 적용하여 탈회 유무를 평가한 후 파라핀 왁스에 연골을 넣고 고정시킨 다음 coronal section을 진행하였다. 탈회 과정을 거친 후 파라핀으로 잘 고정된 조직을 7 μ m로 자른 뒤 hematoxylin & eosin (H&E)과 safranin-O 염색을 시행하였으며 그 후 현미경을 통해 관절 조직의 상태를 관찰하였다.

13) 통계처리

통계의 모든 수치는 mean $\pm$ standard deviation 및 mean $\pm$ standard error of measurement으로 나타냈으며, SPSS program version 22 (IBM, Armonk, NY, USA)를 가지고 one-way analysis of variance 검정을 실시하였다. 통계적 유의성의 평가는 Dunnett's multiple comparison test로 검증하였다. 정상군과 대조군 그리고 대조군과 약물 투여군 사이에 $p < 0.05$ 이면 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»»

1. 항산화능

1) DPPH 라디칼 소거능

실험에 사용된 JBJHT의 항산화능을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과, 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 증가하였다. DPPH 소거능을 IC50값으로 나타낼 때 155.23 $\pm$ 1.22 μ g/mL로 나타났다(Fig. 1).

Fig. 1. Scavenging activity of JBJHT on DPPH free radical. (A) DPPH free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) DPPH free radical scavenging activity of JBJHT. JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. All values are mean±standard error of measurement of triplicate experiments.

2) ABTS 라디칼 소거능

실험에 사용된 JBJHT의 항산화능을 확인하기 위해 ABTS 소거능을 분석한 결과, 농도 의존적으로 ABTS 소거능이 증가하였다. ABTS 소거능을 IC50값으로 나타낼 때 $205.31 \pm 1.84 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타났다(Fig. 2).

3) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

JBHT의 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 $26.87 \pm 0.05 \text{ mg/g}$ 으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 $5.88 \pm 0.04 \text{ mg/g}$ 으로 총 폴리페놀

Fig. 2. Scavenging activity of JBJHT on ABTS free radical. (A) ABTS free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) ABTS free radical scavenging activity of JBJHT. JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). All values are mean±standard error of measurement of triplicate experiments.

Table II. Total Polyphenol and Flavonoid Contents of JBJHT

Prescription	Total polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)
JBHT	26.87 ± 0.05	5.88 ± 0.04

All values are mean±standard error of measurement of triplicate experiments.

JBHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder.

및 플라보노이드 함량을 나타냈다(Table II).

Fig. 3. Cell viability of JBJHT on Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with 25-1000 µg/mL of JBJHT for 24 h. Cell viability was investigated by MTT assay. JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The results are shown by mean±standard error of measurement.

2. 세포독성에 미치는 영향

Raw264.7 cells에 대하여 JBJHT의 단독 처리는 대조군과 비교하였을 때 전 실험 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3).

3. 항염증 효능에 미치는 영향

1) NO

LPS 1 µg/mL를 단독 처리한 군에서는 189.4±9.9 pg/mL의 생성량을 보였다. JBJHT 50 µg/mL 처리군 178.2±5.9 pg/mL, JBJHT 100 µg/mL 처리군 152.8±8.2 pg/mL, JBJHT 250 µg/mL 처리군 120.2±13.8 pg/mL, JBJHT 500 µg/mL 처리군 98.6±10.5 pg/mL로 나타났다. 특히 JBJHT 100 µg/mL ($p<0.05$), 250 µg/mL ($p<0.01$), 500 µg/mL ($p<0.001$) 처리군에서 NO 생성이 유의하게 감소하였다(Fig. 4A).

2) Prostaglandin E₂ (PGE₂)

JBJHT 처리 후 PGE₂ 생성을 분석한 결과, 무처리군 35.5±7.2 pg/mL, LPS 1 µg/mL 처리군 231.0±31.6 pg/mL, JBJHT 50 µg/mL 처리군 160.1±12.9 pg/mL, JBJHT 100 µg/mL 처리군 177.5±18.1 pg/mL, JBJHT 250 µg/mL 처리군 155.3±17.8 pg/mL, JBJHT 500 µg/mL 처리군 134.5±9.6 pg/mL로 나타났다. 특히 JBJHT 500 µg/mL 처리군에서 PGE₂ 생성이 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 4B).

3) TNF-α

JBJHT 처리 후 TNF-α 생성을 분석한 결과, 무처리군 14.8±10.2 pg/mL, LPS 처리 대조군 186.4±39.2 pg/mL, JBJHT 50 µg/mL 처리군 177.8±38.4 pg/mL, JBJHT 100 µg/mL 처리군 158.2±34.5 pg/mL, JBJHT 250 µg/mL 처리군 140.6±30.3 pg/mL, JBJHT 500 µg/mL 처리군 106.2±23.6 pg/mL로 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 4C).

4) IL-6

JBJHT 처리 후 IL-6 생성을 분석한 결과, 무처리군 42.6±9.5 pg/mL, LPS 처리 대조군 434.1±34.1 pg/mL, JBJHT 50 µg/mL 처리군 420.3±38.3 pg/mL, JBJHT 100 µg/mL 처리군 391.7±32.6 pg/mL, JBJHT 250 µg/mL 처리군 329.4±45.6 pg/mL, JBJHT 500 µg/mL 처리군 234.2±37.5 pg/mL로 나타났다. 특히 JBJHT 500 µg/mL 처리군에서 IL-6 생성이 유의하게 감소하였다($p<0.01$)(Fig. 4D).

5) IL-1β

JBJHT 처리 후 IL-1β 생성을 분석한 결과, 무처리군 61.4±4.5 pg/mL, LPS 처리 대조군 364.4±19.6 pg/mL, JBJHT 50 µg/mL 처리군 354.2±16.6 pg/mL, JBJHT 100 µg/mL 처리군 287.1±31.4 pg/mL, JBJHT 250 µg/mL 처리군 295.2±16.1 pg/mL, JBJHT 500 µg/mL 처리군 267.2±12.6 pg/mL로 나타났다. 특히 JBJHT 250 µg/mL 처리군 ($p<0.05$), JBJHT 500 µg/mL 처리군 ($p<0.01$)에서 IL-1β 생성이 유의하게 감소하였다(Fig. 4E).

Fig. 4. Effect of JBJHT on anti-inflammatory effects in Raw264.7 cells. (A) Effect of JBJHT on NO production in Raw264.7 cells (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs blank). NO production was assayed using culture medium of cells treated with 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ of JBJHT for 24 h. NO production was determined by griess reaction, (B) Effect of JBJHT on LPS-stimulated PGE₂ production in the Raw264.7 cells, (C) Effect of JBJHT on LPS-stimulated TNF- α production in the Raw264.7 cells, (D) Effect of JBJHT on LPS-stimulated IL-6 production in the Raw264.7 cells, (E) Effect of JBJHT on LPS-stimulated IL-1 β production in the Raw264.7 cells. Production of PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β was analysed in the medium of Raw264.7 cells treated LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) with or without JBJHT for 24 h. The amount of PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β was measured by immunoassay. The results were presented as the means $\pm$ standard error of measurement (* $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs control and * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs LPS alone). JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, NO: nitric oxide, LPS: lipopolysaccharide, PGE₂: prostaglandin E₂, TNF- α : tumor necrosis factor alpha, IL-6: interleukin-6, IL-1 β : interleukin-1 beta.

4. 지질과산화 분석

1) 혈액 지질과산화

혈청 지질과산화물 분석은 TBARS 생성량을 측정하여 판단하였다. 정상군 $2.66\pm0.06 \mu\text{mol/mL}$, 대조군 $7.93\pm1.14 \mu\text{mol/mL}$, Indo $4.45\pm0.6 \mu\text{mol/mL}$, JBJHT100 $7.83\pm0.37 \mu\text{mol/mL}$, JBJHT200 $6.73\pm1.0 \mu\text{mol/mL}$ 로 나타났으며 JBJHT100과 JBJHT200은 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 보이지 않았다(Fig. 5A).

2) 연골 조직 지질과산화

연골 조직의 TBARS 생성량은 정상군 $7.31\pm0.80 \mu\text{mol/mg protein}$, 대조군에서 $15.28\pm0.93 \mu\text{mol/mg protein}$, Indo

$10.91\pm0.62 \mu\text{mol/mg protein}$, JBJHT100 $10.13\pm1.57 \mu\text{mol/mg protein}$, JBJHT200 $9.87\pm0.86 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 나타났으며 JBJHT100 ($p<0.05$), JBJHT200 ($p<0.01$) 모두 대조군 대비 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5B).

5. 관절 조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 분석

1) NOX4

NOX4의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.04 대비 대조군 1.90 ± 0.17 에서 유의하게 증가하였으며($p<0.001$), Indo 1.35 ± 0.24 , JBJHT100 1.54 ± 0.16 , JBJHT200 1.40 ± 0.14 로 대조군 대비 JBJHT200에서 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 6A).

Fig. 5. Effects of JBJHT on TBARS production. (A) Effects of JBJHT on serum TBARS production, (B) Effects of JBJHT on TBARS production on cartilage tissue. Results are means±standard deviation (n=7/group)(###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01 vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, MIA: monosodium iodoacetate.

2) p47^{phox}

p47^{phox}의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.05 대비 대조군 1.32±0.08에서 유의하게 증가하였으며(p<0.01), Indo 1.01±0.16, JBJHT100 1.05±0.09, JBJHT200 0.84±0.08으로 대조군 대비 JBJHT100 투여군(p<0.05), JBJHT200 투여군(p<0.001)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 6B).

3) p22^{phox}

p22^{phox}의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.06 대비 대조군 1.15±0.05에서 유의하게 증가하였으며(p<0.05), Indo 0.95±0.10, JBJHT100 0.90±0.09, JBJHT200 0.79±0.10으로 대조군 대비 JBJHT100 (p<0.05), JBJHT200 (p<0.01)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 6C).

Fig. 6. Effects of JBJHT on oxidative stress proteins expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on NOX4 expression, (B) Effects of JBJHT on p47^{phox} expression, (C) Effects of JBJHT on p22^{phox} expression. Results are means±standard deviation (n=7/group)(#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Normal and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, NOX4: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, MIA: monosodium iodoacetate.

6. 관절 조직 내 항산화 관련 단백질 분석

1) SOD

SOD의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00±0.09 대비 대조군 0.60±0.04에서 유의하게 감소하였으며(p<0.01),

Indo 0.91 ± 0.12 , JBJHT100 0.67 ± 0.04 , JBJHT200 0.72 ± 0.09 로 JBJHT100과 JBJHT200은 대조군에 비하여 증가하였지만 유의성은 보이지 않았다(Fig. 7A).

2) Catalase

Catalase의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.14 대비 대조군 0.57 ± 0.04 에서 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), Indo 0.94 ± 0.11 , JBJHT100 0.83 ± 0.08 , JBJHT200 $0.95 \pm$

Fig. 7. Effects of JBJHT on antioxidative proteins expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on SOD expression, (B) Effects of JBJHT on catalase expression, (C) Effects of JBJHT on GPx-1/2 expression. Results are means $\pm$ standard deviation ($n=7$ /group)($^{\#}p < 0.01$ vs. Normal and $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, SOD: superoxide dismutase, GPx-1/2: glutathione peroxidase-1/2, MIA: monosodium iodoacetate.

0.14로 대조군 대비 Indo ($p < 0.01$), JBJHT100 ($p < 0.01$), JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 7B).

3) GPx-1/2

GPx-1/2의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.07 , 대조군 0.79 ± 0.07 , Indo 1.06 ± 0.10 , JBJHT100 0.80 ± 0.08 ,

Fig. 8. Effects of JBJHT on inflammatory proteins expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on p-IkBα expression, (B) Effects of JBJHT on NF-κBp65 expression, (C) Effects of JBJHT on p-p38 expression. Results are means $\pm$ standard deviation ($n=7$ /group)($^{\#}p < 0.01$, $^{##}p < 0.001$ vs. Normal and $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, p-IkBα: phosphorylated inhibitor of κBα, NF-κBp65: nuclear factor-kappa B p65, p-p38: phospho-p38, MIA: monosodium iodoacetate.

JBJHT200 1.06 ± 0.15 로 대조군 대비 JBJHT100과 JBJHT200에서 증가했으나 유의성은 없었다(Fig. 7C).

7. 관절 조직 내 염증성 단백질 분석

1) p-I κ B α

p-I κ B α 의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.06 , 대조군 1.16 ± 0.06 , Indo 0.85 ± 0.06 , JBJHT100 0.94 ± 0.07 , JBJHT200 0.83 ± 0.09 로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.05$), JBJHT200 ($p < 0.01$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 8A).

2) NF- κ Bp65

NF- κ Bp65의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.32 ± 0.05 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.001$), Indo 1.14 ± 0.07 , JBJHT100 1.21 ± 0.03 , JBJHT200 1.19 ± 0.03 으로 대조군 대비 JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 8B).

3) p-p38

p-p38의 발현을 확인한 결과, Indo 0.87 ± 0.10 , JBJHT100 0.85 ± 0.11 , JBJHT200 0.73 ± 0.16 으로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.01$), JBJHT200 ($p < 0.01$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 8C).

8. 관절 조직 내 염증성 매개인자 분석

1) COX-2

COX-2의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.08 대비 대조군 1.39 ± 0.07 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), Indo 0.96 ± 0.11 , JBJHT100 1.18 ± 0.12 , JBJHT200 1.08 ± 0.10 으로 대조군 대비 JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 9A).

2) iNOS

iNOS의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.08 대비 대조군 1.44 ± 0.10 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), Indo 1.00 ± 0.14 , JBJHT100 1.16 ± 0.08 , JBJHT200 1.08 ± 0.10 으로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.05$), JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 9B).

9. 관절 조직 내 염증성 cytokine 분석

1) TNF- α

TNF- α 의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.02 대비 대조군 1.24 ± 0.06 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), Indo 1.01 ± 0.08 , JBJHT100 0.77 ± 0.09 , JBJHT200 0.75 ± 0.10 으로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.001$), JBJHT200 ($p < 0.01$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10A).

Fig. 9. Effects of JBJHT on inflammatory mediators expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on COX-2 expression, (B) Effects of JBJHT on iNOS expression. Results are means $\pm$ standard deviation ($n=7$ /group)(^{##} $p < 0.01$ vs. Normal and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, COX-2: cyclooxygenase 2, iNOS: inducible nitric oxide synthase, MIA: monosodium iodoacetate.

2) IL-6

IL-6의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.05 대비 대조군 1.45 ± 0.10 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.001$),

Fig. 10. Effects of JBJHT on inflammatory cytokines expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on TNF-α expression, (B) Effects of JBJHT on IL-6 expression, (C) Effects of JBJHT on IL-1β expression. Results are means±standard deviation ($n=7/\text{group}$) (^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ vs. Normal and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, TNF-α: tumor necrosis factor alpha, IL-6: interleukin-6, IL-1β: interleukin-1 beta, MIA: monosodium iodoacetate.

Indo 0.92 ± 0.17 , JBJHT100 0.97 ± 0.13 , JBJHT200 0.97 ± 0.12 로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.01$), JBJHT200 ($p < 0.01$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10B).

Fig. 11. Effects of JBJHT on proteolytic factors expression on cartilage tissue. (A) Effects of JBJHT on MMP-1 expression, (B) Effects of JBJHT on MMP-3 expression, (C) Effects of JBJHT on TIMP-1 expression. Results are means±standard deviation ($n=7/\text{group}$) ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ vs. Normal and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs. Control). Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, MMP-1: matrix metalloproteinase-1, MMP-3: matrix metalloproteinase-3, TIMP-1: tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1, MIA: monosodium iodoacetate.

3) IL-1 β

IL-1 β 의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.07 대비 대조군 1.38 ± 0.07 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), Indo 1.06 ± 0.14 , JBJHT100 0.96 ± 0.10 , JBJHT200 0.89 ± 0.17 로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.01$), JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10C).

10. 관절 조직 내 단백질 분해 인자 분석

1) MMP-1

MMP-1의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.05 대비 대조군 1.58 ± 0.20 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), Indo 0.97 ± 0.15 , JBJHT100 1.02 ± 0.09 , JBJHT200 1.09 ± 0.08 로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.05$), JBJHT200 ($p < 0.05$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 11A).

2) MMP-3

MMP-3의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.09 대비 대조군 1.28 ± 0.06 에서 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), Indo 0.85 ± 0.12 , JBJHT100 0.86 ± 0.08 , JBJHT200 0.86 ± 0.10 으로 대조군 대비 JBJHT100 ($p < 0.001$), JBJHT200 ($p < 0.001$)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 11B).

3) TIMP-1

TIMP-1의 발현을 확인한 결과, 정상군 1.00 ± 0.12 대비 대조군 0.61 ± 0.03 에서 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$),

Indo 0.72 ± 0.07 , JBJHT100 0.62 ± 0.02 , JBJHT200 0.73 ± 0.06 으로 대조군 대비 JBJHT100과 JBJHT200에서 증가하는 경향이 있었으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 11C).

11. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

1) H&E staining

연골 손상의 회복 상태를 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군의 활막 조직과 연골 등은 정상 상태이지만 대조군에서는 골관절염이 유발되어 불규칙한 연골 표면, 연골의 변성 및 변형이 현저하게 나타났다. JBJHT100과 JBJHT200의 활막 조직 및 연골 등은 대조군과 비교했을 때 정상 상태에 가까워 조직 손상이 억제되었다(Fig. 12A).

2) Safranin-O staining

연골 조직의 proteoglycan 소실 정도를 관찰하기 위해 Safranin-O stain을 실시한 결과, 대조군에서는 골관절염이 유발되어 관절 조직이 변형되고, proteoglycan의 대부분이 파괴되어 연골의 형태학적 변화를 야기했다. 반면, JBJHT100과 JBJHT200에서는 대조군에 비해 연골 조직 변형과 proteoglycan 소실 둘 다 억제되는 것으로 관찰되었다. 또한 JBJHT100보다는 JBJHT200에서 proteoglycan 파괴를 더 억제하였다(Fig. 12B).

Fig. 12. Histological observation on cartilage tissue. (A) Histological sections ($\times 100$) were stained with hematoxylin & eosin staining, (B) Histological sections ($\times 100$) were stained with safranin-O staining. Normal: normal rats group, Control: MIA-induced osteoarthritis with distilled water treated rats group, Indo: MIA-induced osteoarthritis with indomethacin 5 mg/kg treated rats group, JBJHT100: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 100 mg/kg treated rats group, JBJHT200: MIA-induced osteoarthritis with *Jibaekjihwang-tang* 200 mg/kg treated rats group, JBJHT: *Jibaekjihwang-tang* freeze dried powder, MIA: monosodium iodoacetate.

고찰»»»

골관절염은 국소적 관절의 점진적인 관절 연골 소실 및 그에 따른 2차적인 변화와 증상을 동반하는 질환이다. 예전에는 노화의 일부현상으로 생각되었으나 최근에는 단순하게 노화현상만이 아닌 관절연골의 변화가 나타나는 질환으로 생각한다¹⁾.

痺란 閉, 막혀서 통하지 않는다는 뜻이다. 골관절의痺症은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎 혹은 正氣虛弱한 틈으로 經絡을 통해 침입하여 관절에 凝滯됨으로써 氣血運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 관절에 疼痛, 麻木, 酸楚, 重着, 腫脹, 屈伸不利, 심하면 강직성 변형을 초래하는 병증이다. 치료는 風寒濕痺는 辛溫한 약으로 陽氣를 발산시켜 邪氣를 밀어내고, 風熱濕痺는 散風清熱祛濕시키며, 久痺는 溫通溫散시키거나 滋陰시키도록 한다²⁾.

본 연구에 사용된 知栢地黃湯은 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 茯苓, 澤瀉, 牡丹皮로 구성된 六味地黃湯에 知母, 黃栢이 가미된 처방이다. 知栢地黃湯에 대한 연구로는 知栢地黃湯 약침이 혈압을 조절할 수 있고¹⁴⁾ 갱년기 장애를 개선하며¹⁵⁾, 진행성 색소성 자반병을 호전¹⁶⁾시킨 사례가 있다.

앞서 언급한대로 六味地黃湯 및 개별 약제들에 대한 항산화 작용이 입증되었다. 각 본초별로 추가적인 연구를 살펴보면 熟地黃은 補血藥으로 滋陰補血하고 益精填髓하는 효능이 있으며¹⁷⁾, 熟地黃의 수침액이 염증성 세포 활성물질인 TNF- α 및 IL-1의 억제효과가 있음이 밝혀졌다¹⁸⁾. 山藥은 補氣藥으로 補脾養胃, 生津益肺, 補腎澀精하는 효능이 있으며¹⁷⁾ MIA로 유발된 골관절염 모델에서 관절조직 내 염증성 cytokine과 TIMP-1, MMP-1의 유의한 감소를 보였다¹⁹⁾. 山茱萸는 收澀藥으로 補益肝腎, 澀精固脫하는 효능이 있으며¹⁷⁾ 항염증, 항산화 효과뿐만 아니라 사람의 정자 활동성을 증가시킨다고 보고되었다²⁰⁾. 茯苓은 利水退腫藥으로 利水滲濕하며 健脾寧心하며¹⁷⁾, 항염증 효과 외에도 혈관 생성 억제 효능, 면역 반응 조절이 보고되었다²¹⁾. 澤瀉는 利水退腫藥으로 利小便, 清退熱하며¹⁷⁾, 항산화 효과 이외에도 당뇨병, 간질환, 신경계질환, 항종양, 항균, 항진균 등의 연구가 진행되었다²²⁾. 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀하며¹⁷⁾, collagen에 의한 관절염 모델에서 항산화 효과 및 진행을 완화시키는 효능이 보고되었다²³⁾. 知母는 清熱瀉火, 生

津潤燥하는 효능¹⁷⁾이 있고 항염증, 항암, 항산화, 항균, 허혈성 뇌손상에 대한 효능이 밝혀졌다⁶⁾. 黃栢은 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하는 효능¹⁷⁾이 있고 黃栢 약침이 관절염의 IL-1 β 발현을 억제한다는 연구가 있다⁷⁾.

이처럼 知栢地黃湯을 구성하고 있는 각각의 약제는 항산화, 항염증, 면역반응 조절 등의 효과가 실험적으로 확인되었다. 그러므로 각 약제로 구성된 知栢地黃湯 역시 골관절염에 효과가 있을 것으로 예상하여 본 연구를 시행하였다. 본 연구에서는 먼저 知栢地黃湯 추출물 (JBHT)이 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정을 통해 항산화 효과가 있는지 먼저 확인하고 Raw264.7 cells의 생존율을 실험하여 독성을 확인한 후 *in vitro*로 NO, PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 이후 골관절염 rat 모델에 대한 知栢地黃湯의 효과를 검증하고자 아무런 처치를 하지 않은 정상군(Normal), MIA로 골관절염 유도 후 증류수를 경구 투여한 대조군(Control), MIA로 골관절염 유도 후 indomethacin 5 mg/kg 투여군(Indo), MIA로 골관절염 유도 후 JBHT 100 mg/kg 투여군(JBHT100), MIA로 골관절염 유도 후 JBHT 200 mg/kg 투여군(JBHT200) 등 총 5군으로 실험군을 분리하였다. 이들을 대상으로 하여 체중 변화, 식이효율, 뒷다리 체중부하, 지질과산화 분석, 관절조직 내 산화적 스트레스 관련인자, 항산화 관련 단백질, 염증성 단백질, 염증성 매개인자, 염증성 cytokine, 단백질 분해인자, 병리조직학적 변화에 대해 알아보려고 하였다.

동물실험에 앞서 JBHT의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS의 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 농도 의존적으로 증가하였다(Figs. 1, 2). 이를 통해 JBHT가 항산화 능력이 있음이 증명되었다. 이를 토대로 *in vitro* 실험을 위해 Raw264.7 cells에 JBHT를 농도 의존적으로 처리하고 24시간 후 MMT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 측정결과 대조군과 비교시에 세포 독성을 보이지 않았으나 1,000 μ g/mL 농도에서 85.4 $\pm$ 3.2의 생존율을 보여 이후 동물실험에서는 500 μ g/mL까지 농도만 처리하였다(Fig. 3).

골관절염에서 연골의 손상 및 복원을 이해하는데 연골세포의 동화(anabolic) 및 이화(catabolic) 작용과 이의 균형 조절을 이해하는 것이 필요하다. 특히 이화작용을 일으키는 염증성 cytokine, 염증성 매개인자의 영향이

중요하다. 이화작용을 일으키는 염증성 cytokine으로는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등이 있다. 퇴행성 골관절염 환자들에서는 TNF- α , IL-1 β 가 연골세포들에 의해서 발현되며, 이는 matrix metalloproteinases (MMPs), iNOS, COX-2 등을 유도하며 TIMP 등을 억제하여 이화작용을 주도한다. 또한 TNF- α , IL-1 β 는 IL-8, IL-6, NO, PGE₂ 등의 생산을 통해 염증반응을 주도한다. NO는 연골세포에 의해서 분비되며 연골의 단백질과 콜라겐 생성을 억제하고 IL-1 β 를 통하여 MMPs의 생성에 관여한다. PGE₂는 염증과 통증을 주도하는 주요 매개체로 COX-2와 PGE₂ synthase 효소에 의해 생성된다¹⁾. Raw264.7 cells에 JBJHT를 농도 의존적으로 처리하고 NO, PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-1 β 함량을 분석해보니 대조군에 비해 감소했다(Fig. 4). *in vitro* 실험에서도 염증성 cytokine과 염증 매개인자가 조절되어 골관절염에서의 효과가 기대된다.

MIA로 골관절염을 유발한 동물실험은 Kalbhen과 Blum이 최초로 확립하였다²⁴⁾. MIA는 통증, 관절연골의 손상, 기능장애 등의 양상을 사람의 실제 골관절염과 유사하게 만들 수 있고, 주입농도에 따라 다양한 퇴행정도를 가진 동물 모델을 만들 수 있으며 질환의 진행과 통증강도를 정확히 평가할 수 있다는 장점이 있다^{25,26)}.

본 실험에서 사용한 indomethacin은 비스테로이드성 소염진통제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 하나로 prostaglandin의 생성억제 기전이 확실히 밝혀져 있는 약물로 비교적 널리 사용되고 있다. 그러나 indomethacin은 prostaglandin을 생성하는 COX 효소를 억제하는데 그에 따라 위장관 점막 보호 작용을 담당하고 있는 COX-1마저 억제하며 그로 인한 부작용으로 위장관 합병증이 흔히 발생한다²⁷⁾. 이외에 피부발진, 청각부작용 등이 나타날 수 있어²⁸⁾ 신중을 기하여 투여하는 약물 중 하나이다.

혈액 지질과산화물 분석은 TBARS 생성량을 측정하여 판단하였는데 JBJHT는 대조군에 비해 감소했으나 유의성은 없었고(Fig. 5A) 연골조직의 TBARS 생성량을 측정하였을 때는 대조군과 투여군 모두 유의성있게 감소하였다(Fig. 5B).

Superoxide radical (O₂⁻)을 생산하는 효소인 NADPH oxidase는 NOX4, p47^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox} 등으로 구성되며, 세포가 자극을 받아 활성화되면 p47^{phox}가 인산화되고 세포막 단백질인 p22^{phox}와 결합되어 활성화되면

혈관에서의 주된 산화 스트레스인 과산화음이온이 생성된다^{29,30)}. NOX4는 세포막의 p22^{phox}의 조절에 의해 활성화되고 이 과정에서 미토콘드리아의 전자전달계에 의해 과생산된 O₂⁻에 전자를 운반하여 H₂O₂로 전환시키므로 염증반응에 관여한다고 알려져 있다³¹⁾. 본 실험에서 관절 조직에 western blot을 실시한 후 측정된 결과 NOX4의 발현은 JBJHT200 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며(Fig. 6A), p47^{phox}, p22^{phox}의 발현은 모두 대조군 대비 유의하게 감소하였다(Fig. 6B, C). 이를 통해 知栢地黃湯은 연골 조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 중 NOX4를 억제하여 항산화 효과를 나타내어 골관절염에 효과가 있을 것으로 생각된다.

SOD는 산소 대사에 의하여 생성되는 O₂를 H₂O₂로 전환시키며³²⁾, catalase와 glutathione peroxidase에 의해 H₂O₂가 다시 H₂O와 O₂로 분해하는 과정을 통하여 활성 산소를 제거하여 세포 손상을 막게 된다^{33,34)}. 본 연구에서 시행한 검사에서 모든 항산화 단백질은 증가하였다(Fig. 7). 다만 GPx-1/2의 발현은 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 JBJHT의 경구투여가 항산화 단백질을 증가시켜 염증 반응으로 인한 산화적 손상을 억제하는 작용을 한다고 생각된다.

NF- κ B는 inhibitory kappa B와 결합해 세포질 내에서 비활성 상태로 존재하지만 TNF- α 등의 자극으로 비활성 상태의 inhibitory kappa B kinase가 활성화되고, 이때 인산화된 I κ Ba가 분해되어 p65 등의 단백질들이 세포핵 내로 들어와 전사인자 역할을 한다^{35,36)}. 이때 핵에서 전사가 이루어져 염증성 매개인자인 COX-2와 iNOS, 염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6을 분비하게 된다.

Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)는 골격 발달과 뼈 항상성에 중요한 역할을 하며 특히 조골세포의 분화에 영향을 미친다. MAPKs는 p38, ERK, JNK로 구성되며 이 중 p38은 주로 골격을 결정하고 형성하는 역할을 한다³⁷⁾. 또한 많은 연구에서 염증에서 중요한 역할을 하는 p38을 NF- κ B 상위 조절 kinase로서 인용하고 있다. p38 활성을 차단하면, 즉 p38의 인산화가 억제되어지면 염증성 전사 인자인 NF- κ B의 전사 활성을 약화시키는 것으로 나타난다. p38는 다양한 신호전달단계의 필수 구성 요소를 형성하는 serine/threonine kinases의 한 계열이다. 특정 억제제로 p38을 차단하였을 시 NF- κ B 전사 활성이 감소하고 NF- κ B 표적 유전자의 발현이 약

화된다고 보고되었다³⁸⁻⁴⁰⁾. 본 실험에서 p-IkB α 와 p-p38의 발현은 JBJHT100과 JBJHT200에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, NF- κ B의 발현은 JBJHT200에서만 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

Cyclooxygenase는 COX-1과 COX-2로 나뉘어지며 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환하는 효소이다. COX-1은 혈관, 위장관, 신장 등 거의 대부분 조직에 존재하며 보호 작용을 하는 효소로서 다양한 생리적 반응을 매개한다. COX-2는 주로 염증과 관계되는 단핵구세포, 대식세포, 활액막세포에서 발현되고 COX-2 염증 전구물질들에 의해 합성되어 염증 반응에서 나타난다⁴¹⁾.

iNOS는 연골세포에서 염증성 cytokine의 분비, 연골세포의 이화작용을 촉진하는 효소로 자극에 의해 NO를 과생성한다. iNOS에 의해 과량 생성된 NO는 proteoglycan과 collagen의 합성을 모두 억제하고 기질분해효소로 작용하여 연골세포의 사멸과 염증 반응을 조장한다^{42,43)}. 본 실험에서 관절조직 내 iNOS의 발현은 JBJHT100과 JBJHT200에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, COX-2의 발현은 JBJHT200에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9).

TNF- α 와 IL-6은 염증성 cytokine 인자로 TNF- α 는 IL-1, IL-8, IL-6, IL-10, MMPs 등의 염증 매개물질 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고, 연골로부터의 proteoglycan 소실률을 증가시키며 더불어 proteoglycan 재합성을 억제하여 관절연골을 손상시키고 관절염의 진행을 유도한다⁴⁴⁾. IL-6은 급성 염증의 시작 및 만성 염증 면역반응 영구화에 중요한 역할을 한다. 또한 급성 스트레스 상황에서 숙주 방어에 중요한 역할을 한다^{45,46)}. 본 실험에서 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 의 발현은 JBJHT100과 JBJHT200에서 대조군 대비 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

MMPs는 기질단백분해효소로 소아기부터 청장년까지에서는 생명 유지에 필수적 조절 단백질이지만, 노인에서는 정상보다 과다하게 발현하여 염증세포 침윤과 섬유화, 종양 등의 병리적 상황이 나타나게 된다⁴⁷⁾. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)는 MMPs에 길항작용을 하여 MMPs의 분비를 제어하고 이를 통해 연골세포의 동화와 이화작용을 조절하는 것으로 알려져 있다⁴⁸⁾. 본 연구에서 연골조직 내의 단백질 분해인자 MMP-1, MMP-3, TIMP-1를 분석한 결과 JBJHT100과 JBJHT200에서 MMP-1, MMP-3의 유의한 감소가 있었

으나, TIMP-1는 증가하는 경향은 있으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 11). 이러한 점으로 미루어 보아 知栢地黃湯은 연골조직에서 염증매개 인자들의 생성과 염증성 cytokine 분비를 억제하여 항염증 효과가 나타날 수 있을 것으로 생각된다.

골관절염의 병리조직학적 변화를 관찰을 위하여 H&E와 Safranin-O 염색을 실시하였다. H&E 염색은 호염기성인 hematoxylin과 호산성인 eosin이 핵, 세포질, proteoglycan 등을 염색하는 방법이며, Safranin-O 염색은 양이온성 염색소로 chondroitin sulfate, keratan sulfate 등의 음이온과 결합해 연골에 분포하는 proteoglycan의 양에 비례하여 적색 또는 오렌지색으로 염색하는 방법으로 연골의 proteoglycan 농도 변화를 추정할 수 있다⁴⁹⁾. 정상적인 관절연골에서 proteoglycan은 관절연골의 세포외 기질을 이루는 주성분으로 정상 연골 세포에 의해 지속적으로 생산되는 동시에 연골 세포에서 분비된 MMPs로 인해 파괴되어 관절 내에서 농도 균형을 이루게 된다⁵⁰⁾.

H&E 염색 결과에서 MIA로 관절염을 유발한 대조군은 활막 조직과 연골의 변성 및 변형이 현저하게 나타났으나, JBJHT100과 JBJHT200에서는 활막 조직 및 연골 등은 대조군과 비교하여 정상에 가까워 조직 손상이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 12A).

Safranin-O 염색 결과에서 대조군은 골관절염이 유발되어 관절조직이 변형되고, proteoglycan의 대부분이 파괴되었으나, JBJHT100과 JBJHT200에서는 대조군에 비해 관절조직의 변형이 억제되고 proteoglycan의 소실도 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 12B).

이상의 결과들을 종합해 볼 때, 知栢地黃湯은 MIA로 유발된 rat의 골관절염 모델에 항산화, 항염증 작용을 나타내었으며 연골 주변의 proteoglycan을 보존하는 효과가 있으므로 추가적인 연구를 통해 향후 골관절염 치료 약물로서 활용되기를 기대한다.

결론»»»

知栢地黃湯이 산화적 손상, 염증에 대해 미치는 영향과 MIA로 유발된 rat의 체중 변화, 식이효율, 뒷다리 체중부하, 항산화, 항염증 및 조직병리학적 변화를 관찰하

여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성효과가 농도의존적으로 증가하였다.
2. Raw264.7 cells의 생존율을 보았을 때 독성은 없었다.
3. Raw264.7 cells의 NO, 염증성 cytokine 생성을 억제하였다.
4. 관절 조직 내 지질과산화를 억제하였다.
5. 관절 조직 내 NOX4, p47^{phox}, p22^{phox}의 발현량은 감소하였다.
6. 관절 조직 내 SOD, catalase, GPx-1/2의 발현량은 증가하였다.
7. 관절 조직 내 p-IkB α , NF- κ Bp65, p-p38, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현은 감소하였다.
8. 관절 조직 내 MMP-1, MMP-3는 감소하였고 TIMP-1은 증가하였다.
9. 병리조직검사에서 활막 조직 및 연골 손상이 억제되었으며 proteoglycan의 소실도 억제되었다.

이상의 결과로 보아 知栢地黃湯은 항산화, 항염증 효과가 있으며, MIA로 유발된 rat의 골관절염을 진행시키는 인자를 억제하므로 추가적인 연구를 통해 인간의 골관절염의 치료제 개발에 도움이 되기를 기대한다.

References>>>>

1. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013;290, 292, 317, 321.
2. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015;102-16.
3. Yoh SB, Sul JU, Shin MS. Research trends on the treatment of knee osteoarthritis in Korean medicine. The Korean Journal of Acupuncture. 2011;28(1):139-55.
4. Oh K. Euijongguemgam. Seoul:Daesung MoonWha Inc. 1983;49-51.
5. Lee GH, Yoo DY. Evaluation of anti-inflammatory effects of yukmijihwangtang and individual drug substances based on the extraction methods. J Korean Obstet Gynecol. 2012;25(2):89-107.
6. Lee YK, Kim CT, Choi HJ. Anti-inflammatory effect of anemarrhenae rhizoma 80% ethanol extract in RAW 264.7 cells. Kor J Herbol. 2017;32(3):97-103.
7. Jang JH, Kim KS, Kim CH. 1 β inhibitory effect on the

- expression - yellowish and above the youngseon acupuncture Lipopolysaccharide-induced arthritis in the IL: Literature study. J Acupunct Res. 1999;16(1):511-31.
8. Yun YK. Donguibangje and cheobanghaeseol. Seoul: Uiseongdang. 1998;336-7.
9. 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 if tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull. 1989;37(8):2016-21.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7.
11. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem. 1912; 12(2):239-43.
12. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. 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.
13. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 1978;86(1):271-8.
14. Shim YS, Jeon MK, Kim KS, Sohn IC. Effects of Aqua-acupuncture of jibaekjihwangtang on the blood pressure in hypertensive rats. J Acupunct Res. 2004; 21(4):1-18.
15. Lee SH, Kim DC. Aqueous extracts of jibaekjihwang-tang ameliorate ovariectomy-induced climacterium symptoms in mouse. J Korean Obstet Gynecol. 2017;30(2):16-36.
16. Kim HJ, Kim TY, Lee CH, Kim CH. A case report of progressive pigmented purpuric dermatosis improved with jibaekjihwang-tang. The Korean Medicine Ophthalmology&Otolaryngology&Dermatology Society. 2013;26(2):109-16.
17. Korean Herbalogy Society. Herbalogy. Seoul:Young-lim. 2016;201, 221, 235, 345, 348, 581, 633, 688.
18. Jung YS, Kang HW, Lyu YS. Studies on the anti-inflammatory action of teamed Rehmannia glutinosa in central nervous system. J of Oriental Neuropsychiatry. 1999;10(2):59-70.
19. Kim MJ, Park HJ, Kim KJ, Lee JA, Shin MR, Roh SS. Protective effect of dioscoreae rhizoma extracts in MIA-induced rat. Kor J Herbol. 2019;34(4):27-35.
20. Oh MS, Kim DR, Sung EJ, Chang MS, Park SK. Antioxidant effects of corni fructus in GC-1 cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2005;19(6):1541-5.
21. Rios JL. Chemical constituents and pharmacological prop-

- erties of *Poria cocos*. *Planta Med.* 2011;77(7):681-91.
22. Yu JH. Overview for Studies on *Alismatis Rhizoma* in the Korean literatures [dissertation]. Iksan:Wonkwang University; 2012.
23. Kim DH, Song BK, Kim HK. Effect of moutan radicle cortex on collagen-induced arthritis. *The Journal of Traditional Korean Medicine.* 1997;7(2):60-9.
24. Kalben DA, Blum U. Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthritis. *Arzneimittelforschung.* 1977;27(3):527-31.
25. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett.* 2004;370(2-3):236-40.
26. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003;31(6):619-24.
27. Song YJ, Ha CW. The use of COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of osteoarthritis. *J Korean Knee Soc.* 2009;21(2):84-92.
28. Cho YJ, Moon SL, Park KH, Cho NC, Song YW. Comparison of side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs) in rheumatoid arthritis patients. *J Kor Soc Hosp Pharm.* 1998;15(2):186-92.
29. Hultqvist M, Olsson LM, Gelderman KA, Holmdahl R. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2009;30(5):201-8.
30. Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67^{phox} and cytochrome b₅₅₈. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(6):3001-5.
31. Radermacher KA, Winkler K, Kleikers P, Altenhöfer S, Jr Hermans J, Kleinschnitz C, Hhw Schmidt H. The 1027th target candidate in stroke: Will NADPH oxidase hold up? *Exp Transl Stroke Med.* 2012;4(1):1-11.
32. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(15):5785-90.
33. Preiser JC. Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36(2):147-54.
34. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973;179(4073):588-90.
35. Park SH, Lee HJ, Ryu JH, Lee SY, Shin HD, Hong JH, Seok JH, Lee CJ. Effects of silibinin and resveratrol on degradation of I κ B and translocation of NF- κ B p65 induced by tumor necrosis factor- α in cultured airway epithelial cells. *J Pharm.* 2014;58(1):1-6.
36. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone.* 2007;40(2):251-64.
37. Rodríguez-Carballo E, Gámez B, Ventura F. p38 MAPK signaling in osteoblast differentiation. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:40.
38. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(9):717-26.
39. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ Bp65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3285-90.
40. Saha RN, Jana M, Pahan K. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF- κ B in primary human astrocytes via acetylation of p65. *J Immunol.* 2007;179(10):7101-9.
41. Brune K, Hinz B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(1):1-6.
42. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(2):15-20.
43. Sakaguchi Y, Shirahase H, Ichikawa A, Kanda M, Nozaki Y, Uehara Y. Effects of selective iNOS inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. *Life Sci.* 2004;75(19):2257-67.
44. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370(9602):1861-74.
45. Iking-Konert C, Bartz-Bazzanella P, Falagan D, Hofman MW, Schwarting A, Dörner T. Interleukin-6 inhibition as a potential therapeutic target in rheumatic diseases. *Z Rheumatol.* 2014;73(3):269-76.
46. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):125-39.
47. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2000;18(5):1135-49.
48. Lambert E, Dassè E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifunctional proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;49(3):187-98.
49. Lee SH, Kwon KD, Lee SW, Cho SH, Ahn HS. Acetabular degeneration in osteonecrosis of the femoral head. *J of Korean Orthop Assoc.* 2004;39(3):239-46.
50. 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.