대한한의학회지 제34권 제3호(2013년 9월)
J Korean Med. 2013;34(3):69-85
http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013
pISSN 1010-0695 ● eISSN 2288-3339

Original Article

桂枝人蔘湯이 MIA로 유도된 골관절염 유발 Rat에 미치는 영향

안순선, 허동석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of Kyejiinsam-tang in MIA-Induced Osteoarthritis Rats

Soon-sun An, K.M.D, Dong-seok Heo, K.M.D

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study investigated the anti-osteoarthritic effects of Kyejiinsam-tang (hereinafter referred to KIT) on the monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rats.
Methods:
<in vitro>
Anti-oxidative effects of KIT were measured by scavenging activities of DPPH, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). Scavenging activities of anti-oxidation in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cells were also measured for inhibitory effects against the production of inflammatory mediators (tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, interleukin-6).
<in vivo>
Osteoarthritis was induced in rats by injecting MIA in the knee joint. Rats were divided into a total of 4 groups (n=6). The normal group were not treated at all without inducing osteoarthritis whereas the control group were induced for osteoarthritis by MIA and oral medicated physiological saline per day. The positive comparison group was injected with MIA and after 7 days, 2 ㎎/㎏ of Indomethacin. The experimental group was injected with MIA and after 7 days was medicated with 34 ㎎/㎏ of KIT. Indomethacin and KIT were orally-medicated for each substance a total of 4 weeks, once per day.
Weight-bearing on hind legs was measured every week after MIA injection. At the end of the experiment (5 weeks after MIA injection), micro CT (computed tomography)-arthrography and histopathological examinations on the articular structures of knee joint were performed. The effect on inflammatory cytokines and immunological cells in synovial fluid was measured. Volume of cartilage was measured by micro CT-arthrography. Injury to synovial tissue was measured by H & E (hematoxylin and eosin), Safranin-O immunofluorescence.
Results: 1. Cytotoxicity against hFCs was insignificant.
2. KIT showed the potent full term for DPPH.
<in vitro>
1. NO was significantly reduced by KIT (at 100, 200 ㎍/㎖) and ROS was also reduced, but not significantly, by KIT (at 200 ㎍/㎖).
2. IL-6 and IL-1β were significantly reduced by KIT (at 100, 200 ㎍/㎖) and TNF-α was also reduced, but not significantly, by KIT (at 200 ㎍/㎖).
<in vivo>
1. In hind legs weight-bearing measurement, level of weight increased.
2. Functions of liver and kidney were not affected.
3. IL-1β was significantly reduced and TNF-α, IL-6 were also reduced but not significantly.
4. PGE2 (prostaglandin E2), LTB4 (leukotriene B4) were significantly reduced in the KIT group.
5. MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) and Osteocalcin were significantly reduced in the KIT group.
6. Destruction of cartilage on micro CT arthrography was reduced but had no significant differences.
7. Histopathologically, injury to synovial membrane of the KIT group was decreased and proteoglycan content of KIT group was increased.
Conclusions: According to this study, Kyejiinsam-tang has inhibiting effect on the progression of arthritis in MIA-induced osteoarthritis rat. Kyejiinsam-tang has anti-oxidants and anti-inflammation effects, and is related to inhibiting the activity of inflammatory cytokine and injury of volume in cartilage.

Key Words : *Kyejiinsam-tang, osteoarthritis, anti-inflammation, anti-oxidation, MIA-induced.*

・Received : 22 May 2013 ・Revised : 26 June 2013 ・Accepted : 26 June 2013

・Correspondence to : 허동석(Dong-seok Heo)
대전광역시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 부속 대전한방병원 한방재활의학과교실
Tel : +82-42-229-6813, Fax : +82-42-254-3403, E-mail : hurds@hanmail.net

서 론

골관절염은 퇴행성 관절염 또는 퇴행성 관절질환이라고도 불리며, 주로 관절 연골의 국소적 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골 형성 등을 특징으로 한다[1]. 골관절염의 일차적인 변화는 연골에서 시작되고 연골, 뼈, 활막 세포에서 생성된 기질 단백 분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 세포질 분해효소(cytokine)의 국소적인 생성에 의해 유도 된다[2].

골관절염은 風寒濕熱의 邪氣가 經絡으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 痲木, 重着, 屈伸不利 및 심하면 관절의 강직성 변형을 초래하며, 寒者는 溫之하고, 熱者는 淸之하며, 濕痰瘀 등의 有形之邪가 있으면 去之하고, 虛者는 補之한다[1].

골관절염 연구는 藥物, 鍼灸, 藥鍼, 물리적 요법 등을 이용하여 혈액학적, 면역학적, 동태학적 및 조직학적으로 접근하고 있으며, 연골세포의 재생 및 연골보호, 통증 및 관절 운동 개선 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[3].

桂枝人蔘湯은 『傷寒論』[4]에 처음 등재된 桂枝, 人蔘, 白朮, 甘草, 乾薑으로 구성된 처방으로 桂枝[5], 人蔘[6,7], 白朮[8], 甘草[9], 乾薑[10] 등은 항염증 또는 항산화 효과와 관절염에 유효함이 알려졌으나, 복합제제인 桂枝人蔘湯에 대해서는 골관절염에 대한 연구를 접하지 못하였다.

이에 저자는 桂枝人蔘湯이 골관절염에 미치는 영향을 살펴보고자, lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 염증 유발 인자의 변화를 관찰하였고, MIA로 유발된 rat에 대한 염증 매개 인자, 뒷다리 체중 부하 능력, 연골량 및 병리조직학적 변화를 관찰한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 세포 및 동물

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

동물은 수컷 6 주령의 Wistar rat(170-200g)(오리엔트바이오, 성남, 한국)을 사용하였고, 실험 당일까지 고형사료(5L79, 오리엔트바이오, 성남, 한국)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시켰다.

본 연구는 대전대학교 동물 실험윤리위원회의 승인을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 진행하였다(승인번호 : DJUARB2012-011).

2) 약재

실험에 사용한 桂枝人蔘湯(Kyejiinsam-tang, 이하 KIT)은 『傷寒論』[4]과 『新古方撰次』[11]에 근거하여 처방하였고, 구성 약물들은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 정선 후 사용하였으며, 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

3) 시약

본 실험에 사용된 시약은 lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulfoxide(DMSO), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)는 Sigma-Aldrich Co.(st. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배양액, Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone Co.(Logan, Ut, USA), Cell viability assay kit은 Daeil Lab service Co.(서울, 한국)에서, Nitric oxide detection kit은 Intron Biotechnology Co.(수원, 한국)에서 구입하였

Table 1. The Compositions of Kyejiinsam-tang(KIT)

Pharmacognostic nomenclatures	Amount(g)
Cinnamomi Ramulus	8.0
Glycyrrhizae Radix	8.0
Atractylodis macrocephalae Rhizoma	6.0
Ginseng Radix	6.0
Zingiberis Rhizoma	6.0
Total	34.0

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

다. Cytokine Milliplex Map Immunoassay kit은 Millipore Co.(Bellerica, MA, USA)에서, HPLC 분석에 이용된 water와 acetonitrile은 Ducksan Co.(안산, 한국)에서, Rat Total MMP-9(matrix metalloproteinase-9) kit, LTB4(leukotriene B4) kit, Rat TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1) kit, Rat IL-6(interleukin-6) kit, Rat TNF-α(tumor necrosis factor-α) kit, PGE2(prostaglandin E2) kit, Rat IL-1β(interleukin-1β) kit은 R&D System Co.(Minneapolis, USA)에서, 주정 추출에 이용된 주정은 ㈜대한주정판매(전주, 한국)에서 구입하였다. 양성대조군에는 Indomethacin(Sigma Co., USA), 골관절염 유발 주사제로는 Monosodium iodoacetate (MIA)(Sigma. Chemical Co. Ltd, Cat. No. I2512, USA), 마취제로는 Zoletil(Virbae Co., France)과 Rompun(바이엘코리아, 서울, 한국)을 사용하였다. Hematoxylin and eosin 염색과 Safranin-O 염색에는 Hematoxylin(Merck Co., Germany), Eosin Y(Wako Co., Japan), Safranin-O(Merck Co., Germany)를, Micro CT arthrography의 조영제는 Hexabrics 320(Guerbet Co., France)을 사용하였다.

4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan), Freeze dryer(일신바이오베이스, 한국), ELISA reader(Molecular Devices, USA), Luminex(Millipore Co., USA), HPLC (Shimadzu LC-20AD, Japan), HPLC column(ACE 5 C18, 250 × 4.6 ㎜, 5 ㎛)를, Flow cytometry system (BD Biosciences Immunocytometry Systems, USA), Incapacitance Meter Tester(IITC Life Science, california, USA), BD Ultra-Fine ll(Becton, Dickinson & Company, USA), Light Microscope(Carl ZEISS AXIOSKOP-40, Germany), micro CT arthrography (SkyScan, Optoscan, Belgium)를 이용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

KIT 6첩을 분말한 후, 70% 주정과 30% 증류수를 혼합한 800 ㎖에 24시간 침지 후 여과하여, 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ㎖로 감압, 추출, 동결건조 하여 사용하였다. 추출 수율에 따른 한 첩 분량은 4.08 g이었다.

in vitro

1) 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96well plates에 1×104 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, KIT을 각각 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 ㎕의 WST solution을 첨가하여 CO_2 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 30분간 반응 시킨 후, 450 ㎚에서 흡광도의 변화를 측정하여, only cell을 대조군으로 하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2) 항산화 활성 측정

(1) 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 소거능

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 주정에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ㎕와 KIT(25, 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖) 100 ㎕를 각각 혼합하고, 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 증류수를 넣고, DPPH 용액 대신 주정을 넣어 보정 값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

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

(2) 세포내 ROS 생성

Lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species(ROS)를 측정하기 위하여 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양한 후 여기에 LPS(1 ㎍/㎖) 및 KIT(50, 100, 200 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가한 후 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후, DCF-DA 10 ㎛이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다.

염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음 상층액을 제거하고, 다시 PBS 400 ㎕를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

(3) 세포내 NO 생성

Total nitric oxide(NO)의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent 방법으로 측정하였다. RAW 264.7 세포는 96 well plates에 1×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 KIT(50, 100, 200 ㎍/㎖)을 처리하고, LPS(1 ㎍/㎖)로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리한 후 10분간 상온에서 암소 반응 후, N1 buffer 50 ㎕를 처리한 것에 N2 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리하고 10분간 반응시킨 후, 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

3) 염증관련 cytokine 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plates에 3×10^5 cells/㎖가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, KIT(50, 100, 200 ㎍/㎖)를 처리하고, LPS(1 ㎍/㎖)로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 TNF-α, IL-1β, IL-6를 Milliplex map cytokine kit(Millipore Co., Bellerica, MA, USA)을 이용하여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyst software(고마바이오텍, 서울, 한국)를 통해 이루어졌다.

in vivo

1) MIA 주사에 의한 골관절염 유발

Zoletil 0.5 ㎖와 Rompun 0.1 ㎖로 rat을 마취시킨 후 왼쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모하고 골관절염 유발 물질인 Monosodium iodoacetate(MIA)를 31G의 1 ㎖ Insulin Syringe(0.25 ㎜ × 8 ㎜, BD Medical-Diabetes Care, USA)를 사용하여 왼쪽 무릎 관절 내에 50 ㎕ (60 ㎎/㎖)씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9% saline을 사용하였다.

2) 군 분리 및 약물투여

MIA 주사 7일 후에 관절염 유발 유무를 확인하여 관절염이 유발된 동물만을 대조군(Control), 양성대조군(Indomethacin), KIT 투여군(KIT)으로 나누었고, MIA를 주사하지 않은 정상군(Normal)을 포함하여 동물 수는 각 군당 6마리로 하였다. Wistar rats에 MIA를 주사하여 골관절염을 유발시킨 후 일주일이 경과된 이후부터 1일 1회 매일 오전 10시에 대조군에는 생리식염수 2 ㎎/㎏을, 양성대조군에는 Indomethacin 2 ㎎/㎏을, KIT 투여군에는 KIT 34 ㎎/㎏을 4주 동안 경구투여 하였다. 모든 군에서 자유음수와 식이를 실시하였고, 총 5주간 실시하였다.

3) 뒷다리 체중 부하 검사

뒷다리 체중 부하는 Incapacitance Meter Tester를 이용하여 플라스틱 방에 60도 기울기로 세운 후, 각 뒷다리에 가해진 세기를 10초에 걸쳐 평균을 산출하였다. 처치된 동측의 뒷다리에 분포된 체중의 백분율은 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산하였다.

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

4) 혈액분석

최종 실험 종료 후 튜브형 주사기를 이용하여 심장에서 채혈하였다. 전혈을 바이오톡스텍(주)(청주, 한국)에 의뢰하여 AST, ALT, BUN, Creatine을 측정하였다.

5) 혈청 내 염증 cytokine 및 염증 매개 인자 측정

최종 실험 종료 후 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤, 염증성 지표로서 TNF-α, IL-1β, IL-6 등을 측정하고, Prostaglandin E_2(PGE_2), Leukotriene B_4(LTB_4), Matrix metalloproteinase-9(MMP-9), Tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1), Osteocalcin 등의 염증 매개 인자들을 ELISA assay kit로 측정하였다.

6) 연골량 측정

조영제인 Hexabrics 320을 왼쪽 무릎에 투여하고, micro CT arthrography를 사용하여 cartilage volume

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

을 측정하여서, 무릎관절 연골의 파괴 정도를 분석하였다.

7) 병리조직학적 검사

Micro CT arthrography가 끝난 후 무릎 부위를 절단하여, 10% EDTA가 포함된 10% 포르말린 용액에 넣어 관절 조직을 탈칼슘화 시켰다. Radiographic technique를 이용하여 decalcification 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정한 다음 coronal section을 실시하였다. Decalcification 과정을 거쳐 파라핀으로 고정된 조직을 7 ㎛의 크기로 자른 뒤, hematoxylin and eosin(H & E) 및 Safranin-O 염색을 실시하여 100배의 비율로 조직 상태를 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증 세포의 조직 침윤 여부는 H & E 염색 결과에서 확인할 수 있으며, proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인하였다.

3. 통계처리

실험결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 이용하여 통계처리 하였으며, $p< 0.05$에서 유의성을 검정하였고, 그 값은 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 표기하였다.

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 관찰한 결과 RAW 264.7 세포에서 대조군(KIT 0 ㎍/㎖)의 생존율은 100.0±0.4%로 나타난 반면, KIT의 50, 100, 200(㎍/㎖) 농도에서는 각각 112.1±11.7%, 95.9±13.8%, 91.7±13.8%로 나타났다(Fig. 1).

in vitro

1) 항산화 활성에 미치는 영향

(1) DPPH 소거능

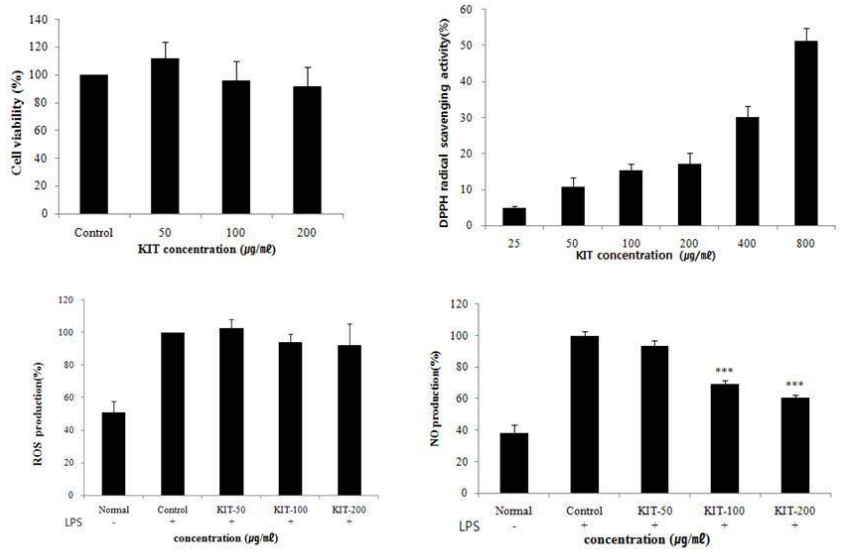

Fig. 1. Effects of KIT on the cell viability, DPPH free radical scavenging activity, the Reactive oxygen species(ROS), the Nitric Oxide(NO) of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 50, 100, 200 ㎍/㎖ of KIT for 24 hours. Cell viability was determined using the WST assay. Extracts were incubated with DPPH solution at 37℃ for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 ㎚. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. Significant value was calculated by compared with control group by student's t-test(***$p<0.001$).

DPPH 소거능은 KIT 25, 50, 100, 200, 400, 800(㎍/㎖)에서 각각 4.9±0.5%, 10.8±2.4%, 15.3±1.9%, 17.2±3.0%, 30.2±3.0%, 51.3±3.5%로 나타났다(Fig. 1).

(2) ROS 와 NO 생성

Reactive oxygen species(ROS) 생성이 대조군에서 100.0±0.0%였을 때 정상군은 51.0±6.7%, KIT 50, 100, 200(㎍/㎖)에서는 각각 102.7±5.2%, 93.9±5.3%, 92.3±12.9%로 나타났다. Nitric oxide (NO) 생성이 대조군에서 100.0±2.7%였을 때 정상군은 38.0±4.0%, KIT 50, 100, 200(㎍/㎖)에서는 각각 93.6±1.7%, 68.9±0.9%, 60.7±4.0%로, KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 유의성 있는 감소(p<0.001)가 나타났다(Fig. 1).

2) 염증 cytokine 생성에 미치는 영향

TNF-α 생성량이 대조군에서 100.0±2.0%였을 때 정상군은 10.0±1.0%, KIT 50, 100, 200(㎍/㎖)에서는 각각 104.9±3.4%, 103.0±9.4, 96.4±7.3%로 나타났다. IL-1β 생성량이 대조군에서 100.0±2.0%였을 때, 정상군은 4.3±4.7%, KIT 50, 100, 200(㎍/㎖)에서는 각각 84.8±16.0%, 45.1±8.8%, 34.4±2.9%로, KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 유의성 있는 감소(p<0.001)가 나타났다. IL-6 생성량이 대조군에서 100.0±2.0%였을 때, 정상군은 2.0±1.0%, KIT 50, 100, 200(㎍/㎖)에서는 각각 89.3±6.3%, 50.0±7.9%, 41.4±14.1%로, KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 유의성 있는 감소(p<0.01, p<0.001)가 나타났다(Fig. 2).

in vivo

1) 뒷다리 체중 부하 측정

뒷다리 체중 부하를 측정한 결과 대조군이 100±11.2%였을 때, 정상군 166.9±2.3%, 양성대조군 164.1±4.7%, KIT 투여군 142.0±16.4%로, KIT 투여군에서 유의성 있는 증가(p<0.05)가 나타났다(Fig. 3).

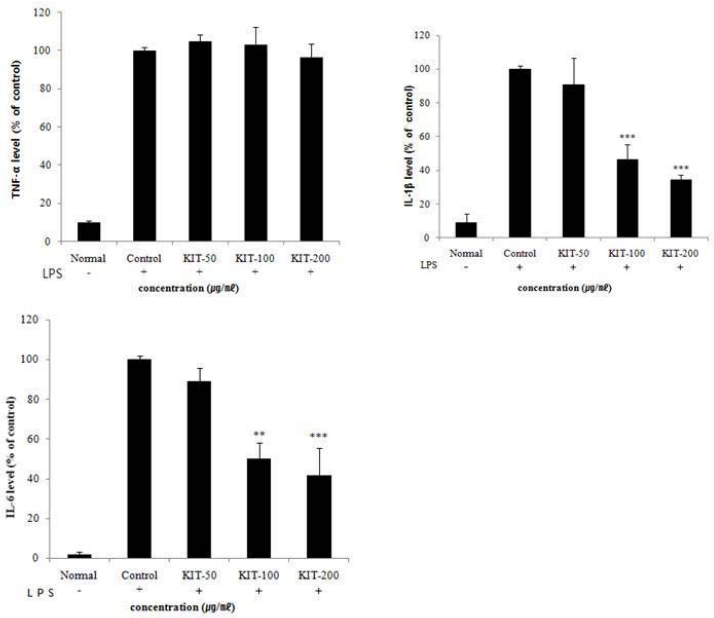

Fig. 2. Effects of KIT on LPS-stimulated TNF-α, IL-1β, IL-6 production in RAW 264.7 cells.

TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6. Cells were treated with LPS(1 ㎍/㎖) and control(0 ㎍/㎖), 50, 100, 200 ㎍/㎖ of KIT for 24 hours. The results are expressed as mean ± SD from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by student's t-test(**p<0.01, ***p<0.001).

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

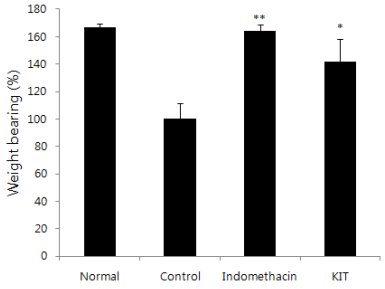

Fig. 3. Effects of KIT on weight bearing changes in the hind legs of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT. The results are expressed as mean ± SD from three independent experiments. Statistically significant value compared with control by t-test(*p<0.05, **p<0.01).

2) 간 기능에 미치는 영향

혈청 AST는 정상군, 대조군, 양성대조군, KIT 투여군에서 각각 130.0±8.7, 162.7±7.1, 160.0±15.1, 172.0±28.2로, 혈청 ALT는 정상군이 32.0±1.7, 대조군 33.7±1.2, 양성대조군 37.7±4.2, KIT 투여군 43.0±8.2로 나타났다(Fig. 4).

3) 신장 기능에 미치는 영향

혈청 중의 BUN 농도는 정상군이 15.30±0.89, 대조군 18.10±1.45, 양성대조군 18.90±2.03, KIT 투여군 17.50±3.04로 나타났고, 혈청 중의 creatinine 농도는 정상군이 0.53±0.02, 대조군 0.55±0.02, 양성대조군 0.58±0.01, KIT 투여군 0.59±0.02로 나타났다(Fig. 4).

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

(1) TNF-α

TNF-α 생성량이 대조군에서 100.0±10.2%였을 때, 정상군은 82.8±18.5%, 양성대조군 85.0±9.0%, KIT 투여군이 94.9±7.2%로 나타나, KIT 투여군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

(2) IL-1β

IL-1β 생성량이 대조군에서 100.0±1.3%였을 때, 정상군은 67.8±3.6%, 양성대조군 80.2±4.1%,

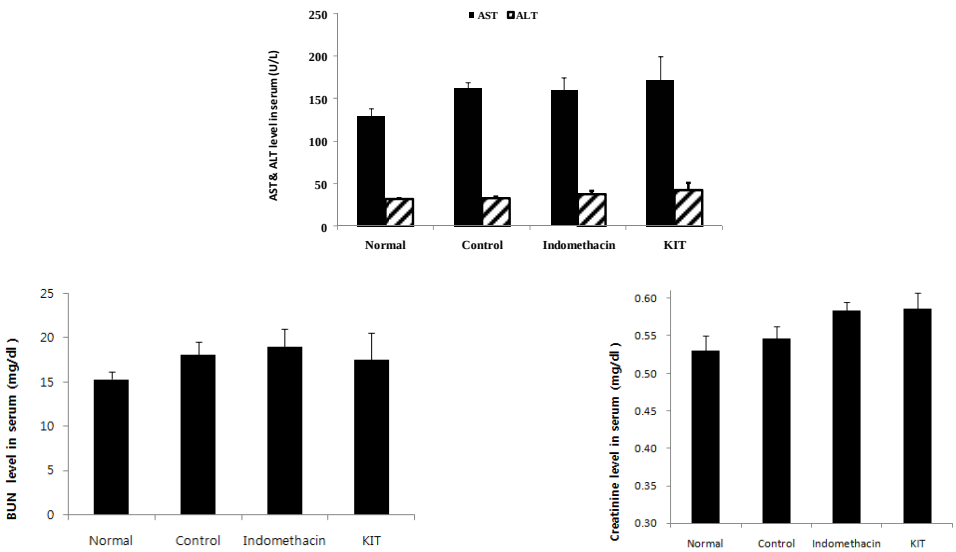

Fig. 4. Effect of KIT on the AST and ALT, BUN and creatinine in MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT. AST: aspatrate aminotransferase, ALT: alanine aminotransterase, BUN: blood urea nitrogen. Values represent the means ± SD.

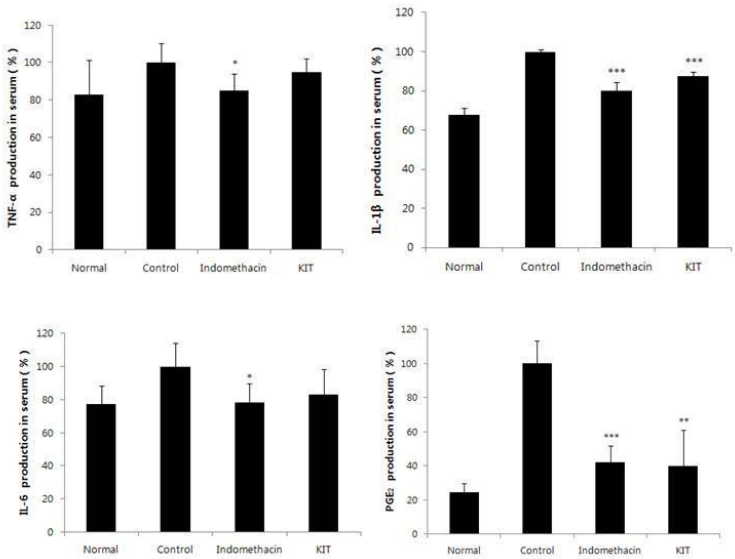

Fig. 5. Effects of KIT on levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE_2 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT, TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, PGE_2: Prostaglandin E_2. Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by t-test(*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

KIT 투여군 87.3±2.5%로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소(p<0.001)가 나타났다(Fig. 5).

(3) IL-6

IL-6 생성량이 대조군에서 100.0±14.0%였을 때, 정상군은 77.2±11.4%, 양성대조군 78.5±11.1 %, KIT 투여군 83.1±15.5%로 나타나, KIT 투여군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

(4) Prostaglandin E2

Prostaglandin E2 생성량이 대조군에서 100.0 ±13.2%였을 때, 정상군이 24.7±4.9%, 양성대조군 42.2±9.5%, KIT 투여군 40.0±20.9%로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소(p<0.01)가 나타났다(Fig. 5).

(5) Leukotriene B4

Leukotriene B4 생성량이 대조군에서 100.0± 12.3%였을 때, 정상군 67.4±10.2%, 양성대조군 69.8±6.5%, KIT 투여군 74.1±12.3%로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소(p<0.05)가 나타났다(Fig. 6).

(6) Matrix metalloproteinase-9

Matrix metalloproteinase-9 생성량이 대조군에서 100.0±1.8%였을 때, 정상군 50.0±4.1%, 양성대조군 64.6±1.0%, KIT 투여군 81.9±8.1%로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소(p<0.01)가 나타났다(Fig. 6).

(7) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 생성량이 대조군에서 100.0±1.6%였을 때, 정상군 54.4±3.9 %, 양성대조군 72.0±4.2%, KIT 투여군 89.4±7.1 %로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소 (p<0.05)가 나타났다(Fig. 6).

(8) Osteocalcin

Osteocalcin 생성량이 대조군에서 100.0±8.5%였을 때, 정상군 41.2±3.0%, 양성대조군 60.1±4.1 %,

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

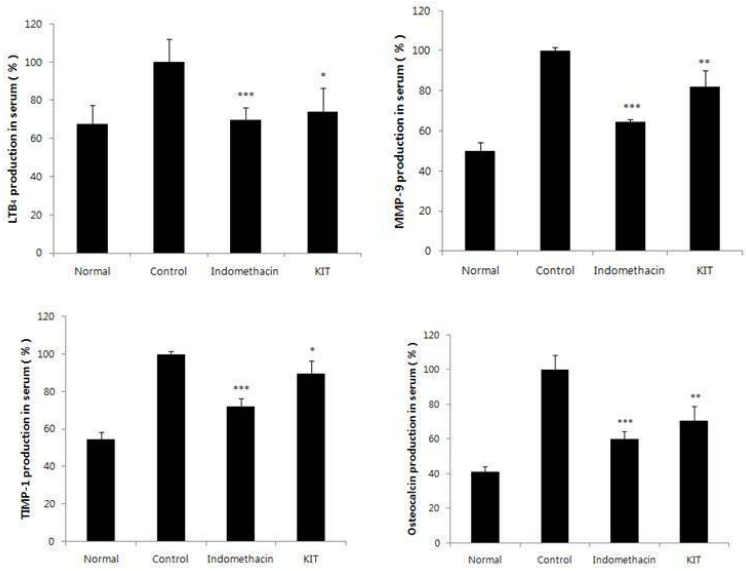

Fig. 6. Effects of KIT on levels of LTB_4, MMP-9, TIMP-1, Osteocalcin in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT, LTB_4: Leukotriene B_4, MMP-9: Matrix metalloproteinase-9, TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Values represent the means ± SD. Statistically significant value compared with control by t-test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

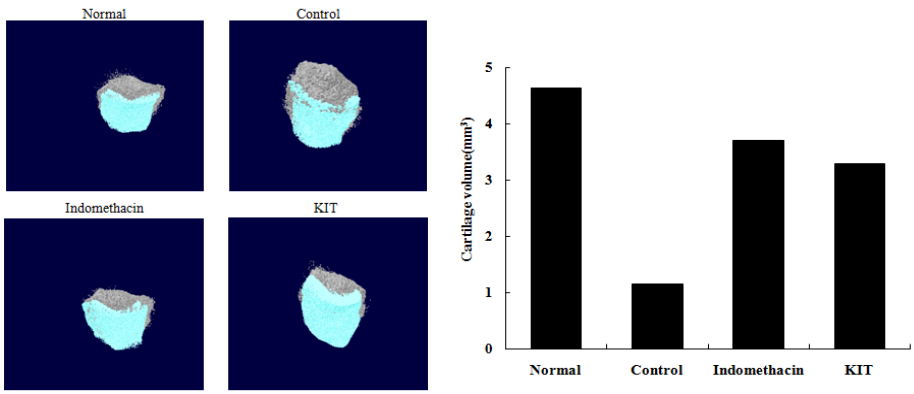

Fig. 7. Effects of KIT on imaging and volume of cartilage degeneration using micro CT arthrography in joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin

KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT

KIT 투여군 70.4±8.6%로 나타나, KIT 투여군에서 유의성 있는 감소($p<0.01$)가 나타났다(Fig. 6).

5) 연골량에 미치는 영향

연골량을 측정한 결과 정상군 4.64 ㎣, 대조군 1.15 ㎣, 양성대조군 3.70 ㎣, KIT 투여군이 3.29 ㎣로 나타나, 대조군에 비해 KIT 투여군에서 연골이 덜 파괴되었다(Fig. 7).

6) 병리조직학적 변화

(1) Hematoxylin & Eosin 염색(H & E)

조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 활막 조직이 정상적으로 위치한 반면, 대조군은 관절 주변에 활막 세포의 과다침투로 인해 연골과 뼈의 침윤으로 활막 조직의 손실이 나타났다. 양성대조군은 대조군에서 비해서 연골과 뼈의 침윤 등이 상대적으로 감소하였고, KIT 투여군도 연골과 뼈의 침윤이 많이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 8).

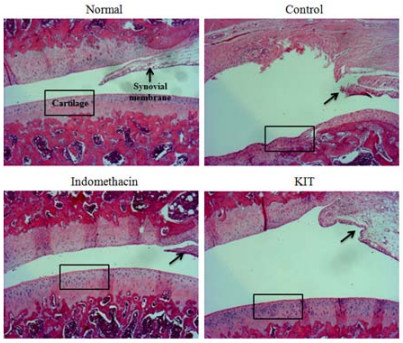

Fig. 8. Effects of KIT on joint pathology(hematoxylin & eosin staining) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats(× 100).

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT. In normal, articular cartilages are sell developed. In control, most of articular cartilage was degenerated. In Indomethacin and KIT, most of articular cartilages are degenerated and appeared homogeneous, but proteoglycan in periphery of degenerated area are remained.

(2) Safranin-O 염색

조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 적으로 위치하였고, 대조군은 관절 주변에 염증세포의 침투가 일어나 붉게 염색된 정상 연골 조직이 MIA에 의해 파괴되어, proteoglycan 조직이 사라진 것을 관찰할 수 있었다. 양성대조군은 관절면에 대조군에서 비해 연골과 뼈의 침윤 등이 적었으며, 붉게 염색된 proteoglycan 조직이 활막 주변에 많이 분포하였다. KIT 투여군은 대조군에 비해 붉게 염색된 강도가 높아 proteoglycan 조직의 분포가 많이 보였다(Fig. 9).

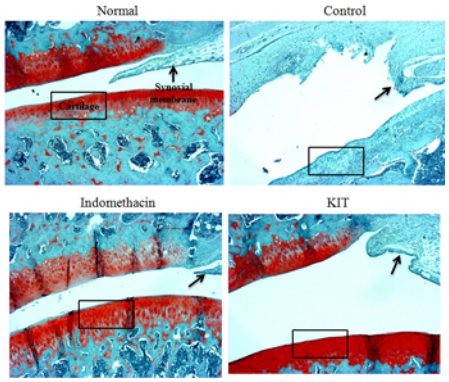

Fig. 9. Effects of KIT on joint pathology(Safranin-O staining) from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats(× 100).

Normal; Normal Wister rat group, Control; MIA-induced osteoarthritis group treated with normal saline, Indomethacin; MIA-induced osteoarthritis group treated with Indomethacin, KIT; MIA-induced osteoarthritis group treated with KIT. Stain intensity of red color increased in proportion to proteoglycan content in normal. The red color disappeared in almost articular cartilage and red color remained in periphery of necrotic area in control. Compare the stain intensity and areas of red color in Indomethacin and KIT with the normal and control.

고 찰

골관절염은 관절 연골의 퇴행성 질환으로, 기질의 감소와 구성요소의 합성 억제로 인한[13] 연골의 파괴를 특징으로 하며, 골극 형성, 연골하 골경화 및 미세골절, 경증의 활막 염증 등과 같은 병리적 소견을 보인다. 연골의 항상성 유지에 중요한 연골세포의 변화와 사멸로 인하여 type II collagen, proteoglycan, aggrecan 등 세포외기질의 생산이 감소하고 분해가 촉진되면서, 연골의 기본 구조가 파괴되어 관절부하를 견디지 못한다[14]. 이러한 연골 파괴 과정에 IL-1β, TNF-α, TGF-β 등과 같은 cytokines이 중요한 역할을 수행한다[15].

고령화 사회와 비만인구의 증가로 인한 유병율은 지속적으로 증가하고 있으며 2008년 국민건강영양조사에 따르면 2008년 성인 중 10.7%%가 골관절염을 앓고 있으며 연령에 따라 비율이 증가하여 80대에는 34.5%에 이르는 것으로 추정된다[16].

골관절염은 痺症의 범주로 주요한 임상증상은

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

痛症이며 宣通이 공통된 治法이다. 風寒濕痺는 辛溫한 약으로 陽氣를 고조시켜 邪氣를 축출하고, 風熱濕痺는 散風淸熱祛濕시키며, 虛한 사람의 久痺는 溫通溫散시키거나 滋陰시키도록 한다[1].

치료법으로는 약물 치료, 물리적 요법, 수술 및 주사 치료 등이 있으나[17], 골관절염으로 인한 사회경제적 비용이 증가되면서 효과적인 치료법을 개발하기 위한 연구가 진행되고 있다. 발병기전에 대한 연구, 연골 파괴를 억제하고 진행을 막기 위한 약물에 대한 연구[14], 本草 및 藥鍼의 항산화 및 항염증 작용[18-20]과 이것을 토대로 골관절염과 결합시키는 노력[21]도 이루어지고 있다.

본 연구에서 사용한 桂枝人蔘湯(KIT)은 『傷寒論』[4]에 처음 등재된 桂枝, 人蔘, 白朮, 甘草, 乾薑으로 구성된 처방으로 "太陽病 外證未除 而數下之 遂協熱而利 利下不止 心下痞硬 表裏不解者 桂枝人蔘湯 主之裏證"이라 하여, 裏證과 表證을 겸한 경우 사용하는 처방[22]이다.

吉益東洞이 著作한『藥徵』[23]에서 桂枝는 "主治衝逆也. 旁治奔豚 頭痛 發熱 惡風 汗出 身痛"이라 하여 진통작용이 언급되었고, 김[6]은 collagen 유발 관절염 모델에서 관절염 억제에 유효함을 보고하였다. 人蔘은『藥徵』[23]에서 "主治 心下痞堅 痞硬 支結也. 旁治 不食 嘔吐 喜唾 心痛 腹痛 煩悸"라 하여 腹痛 및 心痛의 진통작용이 언급되었고, 人蔘 추출액이 관절염 유도 생쥐 모델의 TNF-α, IL-1β 등의 cytokine 감소와 항산화 효과가 밝혀졌다[6,7]. 白朮은『藥徵』[23]에서 "主利水 故能治小便自利不利 旁治身煩疼 痰飮 失精 眩冒 下利 喜唾"라 하여 身體痛에 효과적이라 하였고, 김[8]은 白朮이 collagen유도 관절염 생쥐 모델에서 류마티스 관절염의 중등도 감소와 TNF-α 증가를 억제하는 효과가 있다고 하였다. 甘草는『藥徵』[23]에 "主治急迫也 故治裏急 急痛攣急 而旁治厥冷煩躁 衝逆之等 諸般急迫之毒也"라 하여 진통효과가 언급되었고, 甘草 藥鍼液의 쥐의 대식세포에 대한 항염증 효과가 보고[9]되었다. 乾薑은『藥徵』[23]에서 "主治 結滯水毒也. 旁治 嘔吐 咳 下利 厥冷 煩躁 腹痛 胸痛 腰痛"라 하여 진통작용이 언급되었으며, 쥐의 면역세포에 대한 항염증 효과[10]와 乾薑이 들어간 처방의 골관절염 유발 쥐에 대한 항골관절염 효과와 항산화 및 항염증 작용이 보고[18,20]되었다.

통증에 유효하다는 문헌적 근거와 항염증·항산화 작용이 있는 본초의 구성, 表證과 裏證을 겸한 主治와 溫性藥으로 구성되어 溫散溫通의 효능을 가지고 있음에 착안하여 桂枝人蔘湯이 초기 이후의 골관절염에 적합하리라는 가설을 세우고, 염증 유발 인자 및 MIA로 유발된 병태 동물 모델의 관절 내 염증 상태 변화를 관찰하였다.

桂枝人蔘湯(KIT)의 주정 추출물을 시료로 하여 RAW 264.7 세포에서 항산화 활성과 염증 cytokine에 미치는 영향을 분석하였고, rat의 무릎 내로 monosodium iodoacetate(MIA)를 주입하여 골관절염을 유발한 후 KIT를 경구 투여하여, 뒷다리 체중 부하와 염증 cytokine 및 염증 매개 인자에 미치는 영향, 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

본 연구에서 이용한 RAW 264.7 세포는 대식세포주로서, cytokine의 자극만으로도 스스로 nitric oxide(NO)를 생성하여 세포독성을 갖는 물질의 독성 검정을 위해 유용하게 사용된다[24]. RAW 264.7 세포 활성에 이용한 lipopolysaccharide (LPS)는 동물 실험에서의 자가 면역 질환 유발 물질로, 대식세포를 자극하여 IL-1을 분비시켜 TNF-α 분비를 유발하고 PGE2 생성을 증가시킨다[25].

골관절염 유발 물질로 사용된 MIA는 관절연골세포의 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발 실험에서 관절 연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등이 인체의 골관절염과 매우 유사하다고 알려져 있다[26]. MIA 주입 7일째에는 윤활막과 주위 조직 내에서 변형이 발생된다[27]. Proteoglycan의 소실[28]과 연골 및 연골하골의 기질 붕괴가 일어나며, 금속효소 및 MMP, 아교질 분해 효소, gelatinase의 활성이 증가한다[29]. 또한 파골세포와 골아세포의 활동이 증가하면서 관절 연골의 소실로 인해 연골하골에 부하가 증가하게 되어[30], 연구에 적합한 병변상태라 생각하여 MIA 주사 7일 이후부터 KIT를 경구투여 하였다.

양성대조군에 경구 투여한 Indomethacin은 COX-1을 억제하여 소염, 진통 작용을 갖는 비스테

로이드성 소염진통제로 급성관절염에 유효하다[31].

약재의 안정성 검증을 위한 세포 독성검사에서는 KIT 50, 100, 200(㎍/㎖) 농도에서 세포 생존율이 모두 90% 이상으로 안정성이 검증되었다(Fig. 1).

항산화 물질의 가장 특징적인 것은 유리기와 반응하는 것으로, 활성 radical에 전자를 공여하는 radical 소거 작용은 항산화 효과와 인체에서의 노화 억제 척도로 이용 된다[32]. DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 항산화성 물질과의 반응을 통해 수소원자를 받아들여 고유의 정색성을 잃는 것을 이용한 방법으로, 항산화 효능의 정도를 알 수 있다[33].

KIT의 DPPH 소거 활성을 측정한 결과, 농도가 증가함에 따라 소거활성 역시 증가하여 KIT의 항산화 효능이 확인되었다(Fig. 1).

염증반응을 조절하는 NO는 두 개의 원자로 이루어진 매우 불안정한 free radical로 혈관 확장, 신경 전달 체제, 항균 물질, 면역조절 등에 관여하여[34,35], 과량 생성되면 TNF-α, IL-1 및 IL-6 뿐만 아니라 COX-2 같은 염증 매개 물질을 과생산하여, 과도한 면역 반응을 일으킨다[36]. 또한 NO가 다량 생성되면 reactive oxygen species(ROS)도 같이 생성 된다[37,38].

In vitro에서 RAW 264.7 세포에서 ROS와 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군에 비해 KIT 군에서 감소하였으며, 특히 NO 생성량이 KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 유의성 있게 감소하여, KIT의 항산화 활성이 in vitro에서 유효함을 알 수 있다(Fig. 1).

Cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6은 염증성 활막에서 다량 생산되어 기질의 합성을 저해하고 분해를 촉진하며, PGE2는 활막 섬유아세포에 작용하여 파골세포의 생성을 유도해서 골관절염을 일으키는 것으로, cytokine의 억제가 관절염 치료에서 중요한 역할을 한다[39,40]. TNF-α는 면역반응 초기에 분비되어 IL-1, IL-6, IL-8 및 MMP 등의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키며[41], 관절 연골 기질의 proteoglycan 소실 증가 및 재합성 억제하여 골관절염을 진행시킨다[42]. IL-1β는 골관절염에서 MMP의 생성 및 분비를 촉진하여 연골 기질 파괴를 증가시키고, PGE2의 생성을 촉진하여 proteoglycan을 소실시키고 재합성을 억제한다[43]. IL-6은 IL-1β과 TNF-α에 의해 분비가 촉진되어 파골세포 분화를 증가시켜, 골흡수와 골생성을 방해한다[44]. Proteoglycan은 관절 표면에 proteoglycan membrane을 형성하여 관절면을 보호하고, 관절의 운동으로 발생되는 삼투압을 통해 연골의 영양공급을 한다[45].

TNF-α, IL-1β, IL-6 생성에 대한 KIT의 억제효과를 측정한 결과, IL-1β와 IL-6 생성량은 KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 유의성 있게 감소하였고, TNF-α 생성량은 KIT 200(㎍/㎖)에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 2). KIT 100, 200(㎍/㎖)에서의 유의성 있는 IL-1β와 IL-6 생성 감소로 KIT의 항염증 작용을 알 수 있다.

In vivo에서 rat의 뒷다리 체중 부하는 대조군이 정상군에 비해 감소하였고, KIT 군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3). 이는 KIT의 투여가 골관절염의 통증을 완화시켜 체중 부하를 증가시킨 것으로 생각된다.

간 기능을 반영하는 혈청 AST와 ALT 농도, 신장 기능을 반영하는 BUN과 사구체의 여과율을 반영하는 혈청 creatinine 농도는 모두 대조군에 비해 유의한 증감을 보이지 않아 KIT가 간과 신장 기능에 관해 안전한 약물임을 확인하였다(Fig. 4).

혈청 내 cytokine의 변화를 확인하기 위해 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성량을 측정한 결과, KIT 군에서 감소하였으며 그 중 IL-1β 생성량은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5). KIT 투여가 관절내의 염증 반응을 억제하여 골관절염의 진행을 막는다는 것을 알 수 있다.

Arachidonic acid는 cytokine이나 호르몬 등에 의해 분비되어 prostaglandin, thromboxane, leukotriene과 같은 eicosanoids로 전환되는 불포화 지방산이다[46]. PGE2는 COX의 활성화의 주요 산물로[47] 염증 시 주변 조직을 파괴하고[48], 통증과 연관 있다[49,50]. LTB4는 과도하게 생산되면 염증성 질환을 악화시키고, 류머티스 관절염의 관절액에서 백혈구 수, 면역복합체의 농도 등과 상관관계를 나타내는 인자로 알려져 있으며[51], LTB4의 생산저해제 투여가 류머티스 관절염에 억제효과가 있다고 보고되었다[52].

PGE2와 LTB4의 생성량은 KIT 군에서 유의성

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

있게 감소하여(Fig. 5, 6), KIT가 COX 반응을 억제하는 항염증 작용과 더불어 통증 감소 및 연골 파괴 방지에도 효과적임을 알 수 있다.

염증성 관절에서 연골 및 골 파괴에 중요한 역할을 하는 것이 Matrix metalloproteinase(MMP)같은 단백 분해 효소이며, 그 작용은 Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP) system에 의해 길항 된다[53]. MMP는 생체 내에서 extracellular matrix protein으로 작용하며, 골관절염에서는 proteoglycan의 분해와 연관 있어[54], MMP 활성 조절이 관절염 치료에서 중요하다[55]. MMP의 분비를 제어하고 활성도를 조절하는 TIMP는 교원질 및 단백 다당과 같은 세포외 기질성분을 분해하는 효소로, 골관절염의 병인에 중요한 역할을 한다[56]. Osteocalcin은 골아세포의 활동을 반영하는 골조직 생성표지자로, 파골세포에서 형성되어 파골세포의 분화와 골 재형성에 중대한 작용을 한다[57].

본 연구에서 MMP-9, TIMP-1 및 Osteocalcin 생성량은 KIT 군에서 유의성 있게 감소하여(Fig. 6), KIT 투여가 MMP-9, TIMP-1, Osteocalcin의 생성을 억제하여 proteoglycan 분해와 파골세포의 분화를 감소시켜 연골 및 골을 보호하는 효과가 있음을 알 수 있다.

Micro CT arthrography를 사용하여 연골량을 측정한 결과, KIT 군이 대조군에 비해 연골량 파괴가 감소하였으며(Fig. 7), H & E 및 Safranin-O 염색을 통한 병리조직학적 검사에서도 KIT 군이 증가된 proteoglycan량과 감소된 염증세포 소견을 보여 활막의 손상 정도를 감소시켰다(Fig. 8, 9). 이는 KIT가 항염증 및 진통 작용뿐만 아니라 뼈와 연골의 침윤을 감소시켜 골관절염의 진행을 억제함을 의미한다.

이상의 연구 결과를 종합하면, 桂枝人蔘湯(KIT)의 투여가 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 항산화 및 항염증 효과를 확인할 수 있었고, MIA 유발 골관절염 rat에서 뒷다리의 체중 부하 증가, 혈액 내의 염증 cytokine과 염증매개 인자 발현을 억제하는 항염증 효과, 연골의 변성 및 파괴를 방지에 유효하였다. 따라서 임상적 범주로 확장하는 추가연구를 통하여 향후 골관절염 약물로써 치료에 이용할 수 있으리라 사료된다.

결 론

桂枝人蔘湯(KIT)이 골관절염에 미치는 영향을 살펴보고자, lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 염증 유발 인자의 변화를 관찰하였고, MIA로 유발된 rat에 대한 염증 매개 인자, 뒷다리 체중 부하 능력, 연골량 및 병리조직학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성은 없었다.
2. 농도 증가에 따라 DPPH 소거활성은 증가하였다.

<in vitro>

1. KIT 100, 200(㎍/㎖)에서 ROS 생성량은 감소하였으나 유의성은 없었으며, NO의 생성량은 유의성 있게 감소하였다.
2. TNF-α 생성량은 KIT 200(㎍/㎖)에서 감소하였고, IL-1β와 IL-6 생성량은 KIT 100 , 200(㎍/㎖)에서 유의성 있게 감소하였다.

<in vivo>

1. 뒷다리 체중 부하는 유의성 있게 증가하였다.
2. 간 기능 및 신장 기능에 영향을 미치지 않았다.
3. TNF-α, IL-6 및 IL-1β는 감소하였으며, 그 중 IL-1β가 유의성 있게 감소하였다.
4. PGE2와 LTB4는 유의성 있게 감소하였다.
5. MMP-9, TIMP-1 및 Osteocalcin은 유의성 있게 감소하였다.
6. Micro CT arthrography에서 연골의 파괴가 감소하였다.
7. 병리조직학적 소견에서 활막의 손상정도가 감소하였고 proteoglycan의 생성은 증가하였다.

이상과 같이 桂枝人蔘湯(KIT)은 항산화 및 항염증 효과가 있으며, 골관절염 병리 과정에서 혈액 내의 염증 cytokine과 염증 매개 인자 발현 및 연골 변성

억제가 실험적으로 관찰된 바, 골관절염에 유효하리라 사료된다.

참고문헌

1. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine. Oriental Rehabilitation Medicine 3rd.. Seoul:KOONJA publishing inc. 2011:84.
2. Eugene Braunwald, A Fauci, D Kasper, S Hauser, D. Longo. The Korean Association of Internal Medicine. Harrison's principles of internal medicine 16th ed. Seoul:MIP Publisher. 2006:2083-4,2222-7.
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. Park BH. The commentary sanghanron clinical applications. Kangwon:Uibang publisher. 2004: 317-8.
5. Kim SJ, Park SM, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, et al. Anti-inflammatory effect of Cinnamomi ramulus on collagen induced arthritis;a model for rheumatoid arthritis in DBA/1J mice and cytokine production in raw 264.7 cells. The Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(3):542-7.
6. Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosynthesis of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide. Biol Pharm Bull. 2005;28: 652-6.
7. Jung TY. Inhibitory effect of Korean ginseng extract on type II collagen-induced arthritis. Seoul: Graduate school, Yonsei Univ.; 2009.
8. Kim SH, Park YG. Effects of Atractylodis Rhizoma Alba extract on collagen-induced arthritis in mice. The Korean Journal of herbology. 2012;27(3):1-6.
9. Park JP, Son JH, Kim YM, Lee EY, Lim KH, Kim EH. Suppression of inflammatory macrophage response by Glycyrrhiza Uralensis herbal acupuncture extract. The Korean Journal of Acupuncture. 2011; 28(4):49-58.
10. Ryu HS, Kim HS. Effect of Zingiber officinale roscoe extracts on mice immune cell activation. The Korean Journal of Nutrition Korean. 2004; 37(1):23-30.
11. Lee SY. The new gobangchancha. Seoul:Koonja publisher. 2012:72.
12. TM. Piscaer, JH Waarsing, N Kops, P Pavljasevic, JAN Verhaar, GJVM. van Osch, et al. In vivo imaging of cartilage degeneration using μCT-arthrography. Osteoarthritis and Cartilage. 2008;16(9):1011-7.
13. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry f. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. Arthritis and Rheum. 2002;46(3):704-13.
14. Yun JH. Osteoarthritis update. The Korean Journal of Medicine. 2012;82(2):170-4.
15. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Draqomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism:signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. Eur Cell Mater 2011;21:202-220.
16. Jhun HJ, Ahn K, Lee SC. Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and nutrition examination survey. Anesth Pain Med 2010;5:201-206.
17. Walter R.Frontera. Muscular skeletal disease. Seoul:Koonja publisher. 2003:401.
18. Liu CC. Anti-Oxidants and Anti-inflammation Effects of Geongangbuja-tang. Daejoen:

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.13013

Graduate school, Daejoen Univ; 2011.
19. Choi WJ. The antioxidative and anti-inflammatory effects of lophatheri extracts for herbal-acupuncture via reducing iNOS synthesis induced by LPS in RAW 264.7 Cell. Iksan: Graduated school, Wonkwong Univ.; 2010.
20. Park SD. Effect of Cervi Pantotrichum Cornu herbal acupuncture on protease activities antioxidant in rheumatoid arthritis rats. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2002;19(2):51-64.
21. Sung YS, Choi HJ, Oh JM, Ji JG, Bak JW, Kim DH. The effect of KKBT in papain-induced osteoarthritis mice models. The Journal of Daejeon Oriental Medicine. 2012;21(1):33-52.
22. Textbook Compilation Committee, College of Oriental Medicine, the National sanghanron. Determined sanghanron. Seoul:Ilzungsa. 2003: 342-3.
23. Gil Ik-dong-dong . Yakjing. Seoul:Cheonghong Publisher. 2006:105,116, 129,203,216.
24. Yoo YC. Role of nitric oxide in the nickel and cobalt induced cytotoxicity in RAW 264.7 cell. The Korean Journal of Occupational and Environmental Medicine. 2001;13(3):274-7.
25. Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipolysis-accharideinduced arthritis. Clin Exp Immunol. 1993;93(2):206-11.
26. Cho HJ, Jang JB, Jung JU, Sung SC, Kim TK. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis in elderly koreans. Knee surgery & related research. 2009;21:223-31.
27. Bove S.E., Calcaterra S.L., Brooker R.M., Huber C.M., Guzman R.E., Juneau P.L., et al. 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.
28. Kim WY, Choi JB. Effects of Bee venom and Cervi Cornu Parvum pharmacoacupuncture in monosodium iodoacerare(MIA)-induced osteoarthritis rat. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 2010;20(1):61-77.
29. Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, et al. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis rats by matrix metalloproteinase inhibitors. Osteoarthritis Cartilage. 2001;9: 751-60.
30. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondralbone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. Toxicol Pathol. 2003;31(6): 619-24.
31. Kim NJ, Park JY, Han HC, Chang SH. Analgesic and anti-inflammatory effects of Ibuprofen, Indomethacin and NS-398 on an acute model of arthritis in rats. Korean Journal of Anesthesiology. 2001;40:802-13.
32. Ahn SI, Heuing BJ, Son JY. Antioxidative activity and nitrite scavenging abilities of some phenolic compounds. Korean J. Food Cookery Sci. 2007;23:19-24.
33. Kim SJ. DPPH radical scavenging and ACE inhibitory effects of the aerial parts of Fagopyrum esculentum, and isolation of flavonoids. MS thesis. Sunchon: Sunchon National Univ.; 2004.
34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43:109-42.
35. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med. 1998;25(4-5):434-56.

36. Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. Life Sci. 1997;61(21): 2073-81.
37. Brune B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. Kidney Int Suppl. 2003;84:4-22.
38. Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurol Scand. 1998;98: 53-145.
39. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsuqi Y, et al. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose 6 phosphate isomerase. Arthritis Rheum. 2008;58:754-63.
40. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Deqott C, et al. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody induced arthritis. J Exp Med. 2002;196: 77-85.
41. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. Lancet. 2007;370(9602):1861-74.
42. Lim CK, Yun YG. Anti-rheumatiod arthritis effects of I-Myo-San water extract. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2009; 17(1):99-111.
43. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Semin Arthritis Rheum. 2003;33(3):155-67.
44. Bang SJ, Kim IS, Kim OS, Kim YJ, Jung HJ. IL-6 gene promoter polymorphisms in Korean generalized aggressice periodontitis patients. The Journal of the Korean Academy of Periodontology. 2008;38:579-88.
45. Mary KC, Shawn OF. Kwok HS, Kim JW, Kim HG, Jung HS, Tae GS translation. Biochemistry, Fifth Edition. Seoul:Life Science Publisher 2007:451.
46. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. Trends in Molecular Medicine. 2008;14(10):461-9.
47. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. Anal Biochem. 1999; 271(1):18-28.
48. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998;12:1063-73.
49. Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, et al. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;34(3):187-91.
50. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. Trends in Molecular Medicine. 2008;14(10):461-9.
51. Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 2003;15(5):623-724.
52. Griffiths RJ, Smith M, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, et al. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. J Exp Med. 1997;185: 1123-9.
53. Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1999;26:717-9.
54. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 1999;274: 21491-4.
55. Halliwell B. Oral inflammation and reactive spe-

cies: a missed opportunity. Oral Dis. 2000;6:137.
56. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;49(3):187-98.
57. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christigau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann Rheum Dis. 2001;60: 619-26.