대한한의학회지 제40권 제3호(2019년 9월)
J Korean Med. 2019;40(3):35-58
http://dx.doi.org/10.13048/jkm.19026
pISSN 1010-0695 • eISSN 2288-3339

Original Article

薑黃이 MIA 유도 골관절염 모델에 미치는 영향

김 영 준*
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effects of *Curcuma longa* Rhizoma on MIA-induced Osteoarthritis in Rat Model

Young Jun Kim*
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives: The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of Curcuma longa rhizoma extract in an experimental rat model of osteoarthritis.
Methods: Osteoarthritis was induced in rats by injecting monosodium iodoacetate (MIA) into the knee joint cavity of rats. The rats were divided into 5 groups (Normal, Control, positive comparison, low (CL) and high (CH) concentration groups). Rats in the low concentration (CL) group had MIA-induced osteoarthritis; they were treated with *Curcuma longa* rhizoma extract at a dose of 50㎎/㎏ body weight. Rats in the high concentration (CH) group had MIA-induced osteoarthritis; they were treated with *Curcuma longa* rhizoma extract at a dose of 100㎎/㎏ body weight. Hind paw weight distribution and ROS levels were measured. At the end of all treatments, changes in alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine levels were analyzed. In addition, inflammatory protein levels were evaluated by western blot analysis.
Results: In this study, hind paw weight distribution significantly improved in the CL and CH groups, while. Reactive oxygen species (ROS) production significantly decreased in both. The levels of ALT, AST, BUN, and creatinine did not significantly change in either group. The production of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4), $p47^{phox}$, and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) decreased in both. Catalase, heme oxygenase-1 (HO-1) and superoxide dismutase (SOD) significantly increased in the CL and CH groups, respectively. Nuclear factor erythroid 2 (Nrf2) increased, but there were no significant differences between the experimental and control groups. Inflammatory cytokines, including nuclear factor-kappa Bp65 (NF-κBp65), interleukin-1beta (IL-1β), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), decreased significantly in both the CL and CH groups.
Conclusions: Our results showed that *Curcuma longa* rhizoma extract has anti-inflammatory effects. Anti-inflammatory activity is regulated by the inhibition of inflammatory cytokines and mediators, such as NF-κB, therefore, it suppresses cartilage damage as well.

Key Words : Curcuma longa *rhizoma extract, Osteoarthritis, Anti-inflammation, Monosodium iodoacetate (MIA)*

• Received : 2 July 2019 • Revised : 7 August 2019 • Accepted : 13 August 2019
• Correspondence to : Young Jun Kim
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Daegu Haany University Pohang Korean Medicine Hospital, 411, Saecheonnyeon-daero, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, 37685, Korea
Tel : +82-54-281-0055, Fax : +82-54-281-7463, E-mail : kimyj@dhu.ac.kr

서 론

골관절염 (osteoarthritis)은 가장 흔한 형태의 관절염으로 퇴행성 관절염 (degenerative arthritis), 퇴행성 관절질환 (degenerative joint disease) 또는 변형성 관절증 (osteoarthrosis)으로 불리는데[1], 체중 부하가 걸리는 고관절 및 슬관절에 호발하며[2], 그 유병률은 연령에 비례하여 증가하는 특징을 보여 현대사회의 노령화 추세와 더불어 지속적으로 증가할 것으로 예상된다[3].

薑黃 (*Curcuma longa* rhizoma)은 생강과에 속한 다년생 宿根本草인 薑黃 *Curcuma longa* Linne의 根莖으로, 薑黃에는 turmerone, zingerene, phellandrene, 1,8-cineol, sabinene, borneol, dehydroturmerone, curcumin 등의 精油와 그 외 단당류, 전분, 지방유, 수산염 등이 함유되어 있다[4]. 薑黃에 관하여는 간 손상[5], 폐 손상[6], 만성 신부전[7], 천식[8], 전립선비대[9] 등의 치료 효능에 대한 연구 및 골관절염, 류마티스성 관절염에 대한 약침연구[10,11]가 보고되었다. 또한 薑黃의 주요 성분인 curcumin은 항산화, 항염증, 항암 효과가 있다고 보고되었다[12-15].

MIA 유도 골관절염 동물 모델은 골관절염 실험에서 다용되는 방법으로[16], MIA 유도 골관절염 Rat 모델에서 curcumin의 관절내 주사[17], 경구투여[18], 그리고 薑黃약침의 관절내 주사[10]가 유효함이 보고되었다.

현재까지 골관절염에 관한 연구들은 薑黃의 주요 성분인 curcumin 및 curcumin 복합제제를 이용한 연구가 대부분으로 Rat 모델에서 curcumin의 경구투여[19], 복강내 주사[20], curcumin이 NF-κB 및 ERK 1/2 signaling[21,22]에 미치는 효과에 대한 실험연구, 관절염 환자에 curcumin 경구투여의 효과 및 안전성에 관한 임상시험 연구[23-25] 등 많은 연구가 지속적으로 보고되고 있다. 薑黃 단일 본초을 이용한 연구는 류마티스 관절염 Rat 모델에 薑黃 분말[26]과 薑黃 추출물을 경구투여한 연구[27] 등이 있으나, MIA 유도 골관절염 Rat 모델에 薑黃 추출물 경구투여 효과에 관한 연구는 부족한 실정이다.

한의학에서 薑黃은 破血行氣, 通經止痛의 효능이 있어 風濕痺痛, 關節不利 등에 상용되며[4], 선행 연구를 통하여 보고된 薑黃의 주요 성분인 curcumin의 약리 작용은 골관절염 치료에 유효할 것으로 생각된다.

이에 저자는 薑黃의 골관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 MIA로 골관절염을 유도한 Rat에 薑黃 추출물을 경구투여하여 항산화 효과, 항염증 효과, 조직학적 변화 등을 관찰한 후 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

대한바이오 (경기도, 한국)에서 7주령의 수컷 (200~250g) Sprague-Dawley rat을 공급받아 실험 당일까지 물과 고형 사료 (삼양사, 서울, 한국)를 충분히 공급하였으며, 온도 (22±2℃) 및 습도 (55±5%)가 조절된 상태의 사육실에서 12시간 주기의 light-dark 환경을 유지한 상태로 1주간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 또한 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토, 효율적인 관리 등을 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호: DHU2018-024)을 받았다.

2) 시약

본 실험에 사용된 potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), monosodium iodoacetate (MIA), dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NADPH oxidase

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.19026

4 (NOX4), $p47^{phox}$, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1), nuclear factor erythroid 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), nuclear factor-kappa Bp65 (NF-κBp65), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1beta (IL-1β)의 β-actin, histone과 2차 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9와 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)1, TIMP2의 1차 antibody는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. 그리고 Protease inhibitor mixture, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)를 구입하여 사용하였다. Blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine assay kit는 아산제약주식회사 (화성, 한국)에서 구입하였다. Nitrocellulose membranes와 ECL Western Blotting Detection Reagents는 Amersham GE Healthcare (Little. Chalfont, Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위하여 BCA protein assay kit를 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 약재 추출

본 실험에서는 薑黃 (*Curcuma longa* rhizoma)을 옹기한약국 (대구, 한국)에서 구입하여 생약 규격집에 따라 관능검사를 하였으며, 약전규격에 합격한 것을 정선하여 사용하였다. 300g 분량에 30% EtOH 3,000㎖를 가하여 2시간 동안 열탕 추출기에서 추출하여 얻은 추출액을 NO 2. paper filter를 사용하여 여과하였다. 여과액을 감압 증류장치로 농축한 후 실험에 사용하였다. 薑黃 추출물의 수율은 7.01%였다.

4) 실험기기

본 실험에서는 냉장 초고속 원심분리기 (라보진, 서울, 한국), AE-6530 mPAGE (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), 전자체중계 (카스, 양주, 한국), BX-51 편광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan), Deep-freezer (Sanyo Co., Tokyo, Japan), DWT-1800T (대웅바이오, 화성, 한국), Incapacitance Meter Tester 600 (IITC Life Science Inc. Woodland Hills, USA), UV spectrophotometer (Infinite m200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland), Sensi-Q2000 Chemidoc (루젠사이언스, 서울, 한국), Vortex mixer (Vxmnal, Ohaus, NJ, USA) 등의 기기를 사용하였다.

2. 방법

1) 지표 성분 측정

전처리한 薑黃 30% EtOH 추출물은 HPLC를 이용하여 curcumin 함량을 분석하였다. 표준품으로 Sigma사의 curcumin을 사용하였다. column은 Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6㎜×150㎜)을 40℃로 유지시켜 사용하였다. 유속은 1.0㎖/min으로 하였고 10 ㎕를 주입하여 420nm에서 검출하였다. 이동상 A는 0.1% formic acid 수용액을, B는 formic acid을 0.1% 희석한 acetonitrile을 사용하였으며, A 용매 65%, B 용매 35%의 일정한 조건으로 분석한 35% Isocratic elution mode를 사용하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. The Operating Condition of HPLC for Analysis of Curcumin

Instrument Agilent 1260 series
Column Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 ㎜ × 150 ㎜
Mobile phase A (0.1% formic acid in water)
B (0.1% formic acid in acetonitrile)
Detector 420 ㎚
Flow rate 1.0㎖/min
Temperature 40℃
Injection volume 10㎕

2) 약물투여와 군 분리

실험군은 총 5개의 군으로 아무런 처치를 하지 않

은 정상군 (Nor), MIA로 골관절염을 유발시킨 후 증류수를 경구투여한 대조군 (Con), MIA로 골관절염을 유발시킨 후 indomethacin 5㎎/㎏ body weight 경구투여한 양성 대조군 (Indo), MIA로 골관절염을 유발시킨 후 *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH 추출물 50㎎/㎏ body weight를 경구투여한 실험군 (CL), MIA로 골관절염을 유발시킨 후 *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH 추출물 100㎎/㎏ body weight를 경구투여한 실험군 (CH)으로 이루어졌다. 각 군별 8마리씩 군 분리를 하였으며, 양성대조군 (Indo)과 약물 투여군들은 매일 경구로 약물투여를 진행하였다.

① 정상군 (Nor) : 골관절염을 유발시키지 않은 군
② 대조군 (Con) : MIA로 골관절염을 유발시킨 후 증류수를 경구투여한 군
③ Indomethacin 투여군 (Indo) : MIA로 골관절염을 유발시킨 후 indomethacin 5㎎/㎏ body weight를 경구투여한 군
④ 薑黃 추출물 저농도 투여군 (CL) : MIA로 골관절염 유발시킨 후 薑黃 30% EtOH 추출물 50㎎/㎏ body weight를 경구투여한 군
⑤ 薑黃 추출물 고농도 투여군 (CH) : MIA로 골관절염 유발시킨 후 薑黃 30% EtOH 추출물 100㎎/㎏ body weight를 경구투여한 군

3) MIA에 의한 골관절염 유발

골관절염을 유발시키지 않은 정상군을 제외한 Rat에 마취제인 Zoletile mixture (Virbac, Carros, France) 3.5㎎/㎏을 복강에 투여하여 마취시켰다. 골관절염 유발을 위하여 실험동물의 우측 무릎 주변을 깨끗이 제모한 뒤 골관절염 유발물질인 monosodium iodoacetate (MIA)를 0.3㎖ 31 G 인슐린 주사기 (BD Ultra-Fine Ⅱ, NJ, USA)를 이용하여 뒷다리 우측 무릎의 관절강에 50㎕ (80㎎/㎖)씩 투여하였다. MIA 희석을 위하여 0.9% saline을 사용하였다.

4) 체중과 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 전자체중계를 이용하여 1회/2일으로 동일 시간, 동일 조건하에서 측정하였다. 식이섭취량은 2일 동안 공급된 사료에서 2일간 섭취 후 남은 사료량을 측정하여 각 실험군의 1일 사료섭취량을 산출하였다.

5) 혈청 내 간 손상 지표 측정

Rat의 복대정맥에서 혈액을 채혈하여 4,000rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었으며, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) assay kit는 제작사의 프로토콜에 의하여 측정하였다.

6) 혈청 내 신장 손상 지표 측정

Rat의 복대정맥에서 혈액을 채혈하여 4,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었으며, BUN 및 creatinine assay kit는 제작사의 프로토콜에 의하여 측정하였다.

7) 뒷다리 체중 부하 측정

측정일은 MIA 주사 전일, 주사 후 1주, 2주, 3주에 각각 시행하였으며, Incapacitance tester를 사용하여 양측 뒷다리 무게를 각각 측정하였다. MIA에 의하여 골관절염이 유발되면, Rat는 MIA를 투여하지 않은 건측의 다리에 의지를 하여 tester의 holder 안에 서게 된다. Rat의 복부가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 양측 뒷다리의 각각 발무게 (g)를 측정하여 나타냈으며, 실험결과는 골관절염이 유발된 뒷다리 (우측 뒷다리) 체중 부하량에 대한 정상 뒷다리 (좌측 뒷다리) 체중 부하량을 계산하여 체중부하비율을 먼저 구하고, 정상군의 체중부하비율을 기준으로 각 군의 체중부하비율을 구하여 평균±표준오차로 나타내었다.

$$\int \text{체중부하비율} = \frac{\text{정상 뒷다리의 체중 부하량}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 체중 부하량}}$$

$$\iint \text{상대적 체중부하} = \frac{\text{각 군의 체중부하비율}}{\text{정상군의 평균 체중부하비율}} \times 100$$

8) DPPH free radical 소거 활성 측정

薑黃 30% EtOH 추출물의 항산화 소거 활성을 측정하는 방법으로 Blosis에 의한 DPPH free radical 소거법을 사용하였다[28]. 100㎕의 일정농도 시료와 100㎕의 60㎛M DPPH 용액을 넣어 혼합한 뒤, 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 540㎚에서 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 산출하였다. 흡광도를 50% 감소시키는데 요구되는 시료의 양을 IC_{50} 값으로 하여 나타내었다.

9) ABTS free radical 소거 활성 측정

薑黃 30% EtOH 추출물의 항산화 소거 활성을 평가하기 위하여 ABTS free radical 소거활성을 측정하였다[29]. 7mM ABTS, 2.45mM 과황산칼륨(Potassium persulfate)을 증류수에 녹여 12시간 동안 차광 상태로 반응시킨 후, 이 반응액을 415㎚에서 EtOH를 사용하여 0.70±0.02의 흡광도로 보정하였다. 95㎕ ABTS 용액에 시료 5㎕를 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후 415㎚에서 흡광도를 측정하였다.

10) 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

혈액은 복대정맥에서 채혈하여 4,000rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. reactive oxygen species (ROS)의 측정을 위하여 25mM DCF-DA를 혼합한 다음 형광 광도계를 사용하여 0분부터 매 5분마다 530nm emission wavelength와 485nm excitation wavelength를 이용하여 30분 동안 측정하여 산출된 값을 계산하였다. 혈청에서 ROS를 측정하기 위하여 Kooy[30] 방법을 시행하였다.

11) Western blot

관절조직에서 세포질을 얻기 위하여 15mM CaCl2, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl2, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M DTT, 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣은 후 티슈 그라인더 (Biospec Products, OK, USA)를 이용하여 분쇄하여 10% NP-40 용액을 첨가하였다. Ice 위에서 20분간 정치시킨 다음 12,000 rpm으로 2분 동안 원심 분리하여 세포질을 포함하는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위하여 10% NP-40가 첨가된 buffer A에 2회 씻어내고, 100㎕의 buffer C (10% glycerol, 50mM KCl, 50mM HEPES, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.3mM NaCl, 0.1mM PMSF)를 첨가하여 재부유 시킨 다음 10분 간격으로 vortex을 3회 하였다. 4℃에서 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 핵을 포함하는 상층액을 얻어 −80℃에서 각각 냉동하여 보관하였다. 관절조직 세포질의 NOX4, $p47^{phox}$, RAC1 HO-1, SOD, catalase, GPx, iNOS, TNF-α, IL-1β, MMP-2, MMP-9, TIMP1, TIMP2 각각의 β-actin과 핵내 NF-κBp65, Nrf2의 Histone 단백질 발현을 측정하기 위해서 8∼15% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 10㎍ 단백질을 전기영동한 뒤, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하고 4℃에서 overnight 시킨 후 PBS-T로 6분 간격으로 5회 세척하였다. 각각 처리된 1차 antibody에 이용되는 2차 antibody (PBS-T로 희석하여 1:3000 비율로 사용)를 이용하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음, PBS-T를 사용하여 6분 간격으로 5차례 세척하였다. 또한, GE Healthcare에 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 노출시킨 다음, Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜서 단백질 발현을 확인하고 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 해당 band를 정량하였다.

12) 조직학적 관찰

실험 종료 후 무릎 관절 부위를 절단한 다음 10% EDTA가 포함된 10% formalin 용액에 담가서 관절을 탈회시켰다. Radiographic technique을 사용하여 탈회 유무를 확인한 뒤 paraffin wax에 관절을 넣고 고정한 후 coronal section을 시행하였다. 탈회 과정을 거쳐 paraffin으로 고정된 조직을 7㎛ 크기로 자른 후, Hematoxylin and eosin (H&E), Safranin O 염색을 한 후 조직 상태를 관찰하였다. 염증 반응의 발생, 염증 세포의 조직 침윤, 활막 세포의 증식 등에 대한 여부는 H&E 염색 결과를 통하여 확인하였다. 관절 조직과 proteoglycan의 파괴 여부는 Safranin O 염색 결과를 통하여 확인하였다.

13) 통계분석

모든 실험은 각 군별 8마리 Rat의 결과값 중 최고값과 최저값을 제외한 6마리의 결과값을 평균과 표준오차로 표시하였다. 통계처리는 SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하였으며, 다중비교 시행 전 5개 군 전체를 대상으로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하여 5개 군간 차이에 대한 전반적인 검정을 먼저 시행한 후 군간 차이가 확인될 시 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 하여 군간의 유의성을 측정하였다. p-value < 0.05에서 유의수준을 검증하였다.

결 과

1. 성분 분석

HPLC를 이용하여 薑黃 30% EtOH 추출물의 pattern을 분석한 결과, 420nm에서 retention time이 23.56분, 28.26분, 33.77분대에 peak를 나타내었다. HPLC를 이용한 정량분석 결과 薑黃 30% EtOH 추출물의 curcumin 함량은 0.72mg/g으로 나타났다 (Fig. 1).

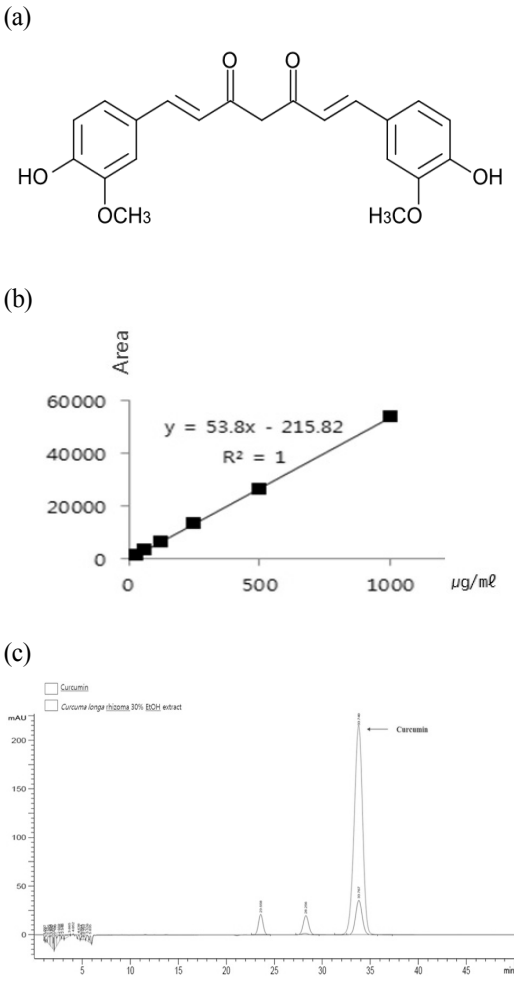

Fig. 1. HPLC profile of combined extract of *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract.
(a) Chemical structure of Curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$), (b) Linearity curve of curcumin, (c) HPLC profile of Curcumin and *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract.

2. 체중 및 식이섭취량

MIA 유발 후 2주 동안 모든 군에서 체중이 증가하였으며 대조군과 비교하였을 때 투여군들 간의 체중변화량은 유의성이 나타나지 않았으며 식이섭취량 또한 각 군간의 유의성은 없었다 (Table 2).

Table 2. Body Weight and Food Intake

Group	Body weight			Food intake (g/day)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g)	
Nor	329.91 ± 6.53	373.82 ± 9.04	43.91 ± 5.63	22.76 ± 1.84
Con	310.73 ± 12.47$^{\#\#\#}$	355.64 ± 16.45$^{\#}$	44.91 ± 6.88	20.74 ± 3.03
Indo	312.00 ± 14.61	356.00 ± 27.56	44.00 ± 17.26	20.31 ± 1.00
CL	305.78 ± 8.54	339.56 ± 19.49	33.78 ± 20.33	21.85 ± 1.14
CH	315.33 ± 12.94	360.22 ± 15.87	44.89 ± 6.15	22.18 ± 0.97

All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. $^{\#}$, Significantly different from the normal (#, p<0.05 ; $^{\#\#\#}$, p<0.001). Nor; normal rats not receiving MIA with normal diet, Con; MIA-induced osteoarthritis rats treated with water, Indo; MIA-induced osteoarthritis rats treated with indomethacin 5 ㎎/㎏ body weight, CL; MIA-induced osteoarthritis rats treated with *Curcuma longa* rhizoma extract at a dose of 50 ㎎/㎏ body weight, CH; MIA-induced osteoarthritis rats treated with *Curcuma longa* rhizoma extract at a dose of 100 ㎎/㎏ body weight.

3. 혈청 내 간 손상 지표 분석

1) ALT

ALT를 측정한 결과, 정상군 2.70±0.20 IU/L에 비하여 대조군은 3.16±0.14 IU/L로 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 3.52±0.29 IU/L, CL 투여군은 3.61±0.23 IU/L, CH 투여군은 3.56±0.09 IU/L로 증가하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 2).

2) AST

AST를 측정한 결과, 정상군 62.17±2.23 IU/L에 비하여 대조군은 77.06±2.31 IU/L로 유의성 ($p<0.01$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 81.34±3.19 IU/L로 증가하였고, CL 투여군은 69.80±6.60 IU/L로 감소하였고, CH 투여군은 84.56 ± 1.45 IU/L로 증가하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 3).

4. 혈청 내 신장 손상 지표 분석

1) BUN

BUN을 측정한 결과, 정상군 14.51±0.6 1mg/dL에 비하여 대조군은 15.99±0.31 mg/dL로 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 17.14±0.75 mg/dL, CH 투여군은 16.03±0.59 mg/dL로 증가하였고 CL 투여군은 14.65±0.25 mg/dL로 감소하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 4).

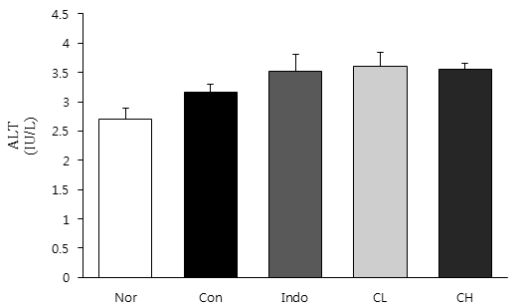

Fig. 2. Alanine transaminase (ALT) in serum.
Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups.

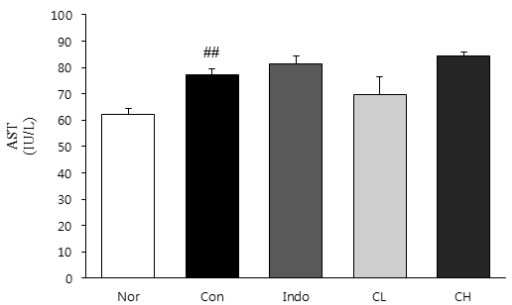

Fig. 3. Aspartate transaminase (AST) in serum.
Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (##, p<0.01)

2) Creatinine

Creatinine를 측정한 결과, 정상군 0.98±0.07 mg/dL에 비하여 대조군은 0.83±0.15 mg/dL로 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.01±0.08 mg/dL로 증가하였고, CL 투여군은 0.67±0.10 mg/dL, CH 투여군은 0.67±0.14 mg/dL로 감소하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 5).

5. 뒷다리 건측 체중 부하의 변화

뒷다리 체중 부하는 총 4회 측정 하였으며, MIA 주사하기 전날과 실험기간 중 1주 간격으로 뒷다리 체중 부하를 측정하였다. 정상군의 뒷다리 체중부하 비율을 100으로 할 때, 각 군의 상대적인 뒷다리 체중 부하 변화를 측정한 결과, 약물 MIA 주사 2주 후에는 정상군 97.45±10.89에 비하여 대조군은 279.32 ± 55.82로 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo군은 191.39±77.62로 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였고, CL 투여군은 258.16±103.42로, CH 투여군은 230.36±108.48로 감소하였으나 유의성은 없었다.

MIA 주사 3주 후 뒷다리 체중 부하 변화는 정상군 102.94±21.87에 비하여 대조군은 644.25±239.77로 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo군은 127.89±54.03, CL 투여군은 257.79±62.75, CH 투여군은 160.98±65.47로 모두 유의성 ($p<0.001$) 있게 감소하였다 (Table 3).

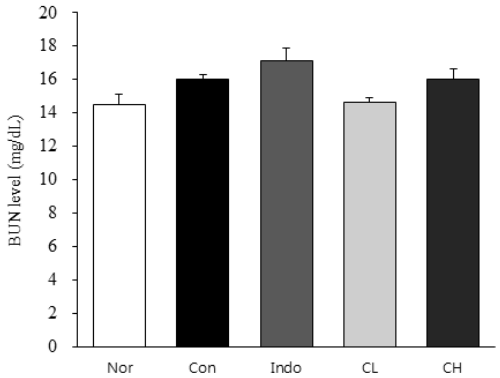

Fig. 4. Blood urea nitrogen (BUN) in serum.
Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups.

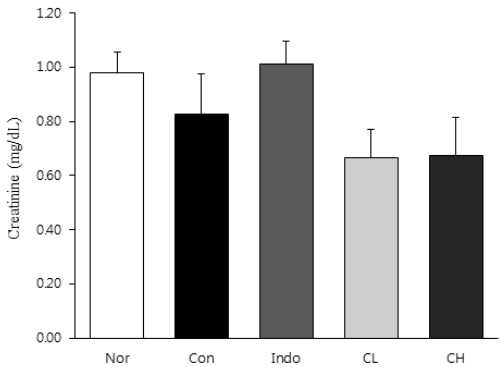

Fig. 5. Creatinine in serum.
Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group.There is no significant difference in the experimental groups.

Table 3. The Changes in Relative Hind Paw Weight Distribution in MIA-induced Osteoarthritis Rats

Group	0 weeks	1 weeks	2 weeks	3 weeks
Nor	100.18 ± 14.97	98.66 ± 12.03	97.45 ± 10.89	102.94 ± 21.87
Con	106.90 ± 15.84	180.14 ± 49.22$^{\#\#}$	279.32 ± 55.82$^{\#\#\#}$	644.25 ± 239.77$^{\#\#\#}$
Indo	103.25 ± 13.10	204.26 ± 36.02	191.39 ± 77.62*	127.89 ± 54.03***
CL	109.11 ± 14.74	194.94 ± 72.15	258.16 ± 103.42	257.79 ± 62.75***
CH	97.47 ± 13.11	193.96 ± 69.76	230.36 ± 108.48	160.98 ± 65.47***

All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. Refer to Table 2 for groups. $^{\#}$, Significantly different from the normal ($^{\#\#}$, $p<0.01$; $^{\#\#\#}$, $p<0.001$). *, Significantly different from the control (*, $p<0.05$; ***, $p<0.001$).

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.19026

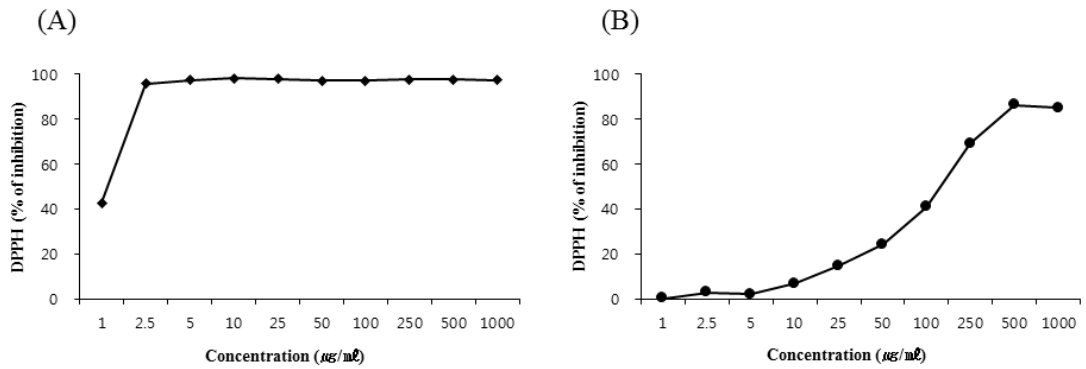

Fig. 6. Scavenging activity of *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract on DPPH radical.
(A) Scavenging activity of L-ascorbic acid against DPPH radical, (B) Scavenging activity of *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract against DPPH radical.

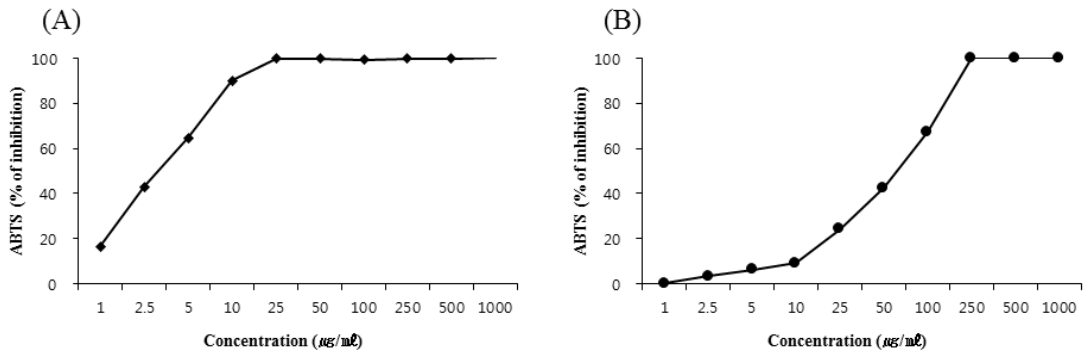

Fig. 7. Scavenging activity of *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract on ABTS radical.
(A) Scavenging activity of L-ascorbic acid against ABTS radical, (B) Scavenging activity of *Curcuma longa* rhizoma 30% EtOH extract against ABTS radical.

6. DPPH radical 소거능

薑黃 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH free radical 소거능 측정방법을 이용하였으며, 항산화 효과로 널리 알려진 L-ascorbic acid을 대조군으로 사용하여 측정하였으며 측정 결과 대조군인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 1.20±0.01 ㎍/㎖으로 나타났으며 薑黃 추출물 IC_{50} 값은 148.46±0.61 ㎍/㎖으로 나타났다 (Fig. 6).

7. ABTS radical 소거능

薑黃 추출물의 ABTS free radical 소거능 측정 결과 대조군인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 3.30±0.09 ㎍/㎖로 나타났으며 薑黃 추출물의 IC_{50} 값은 65.38 ±0.83 ㎍/㎖로 나타났다 (Fig. 7).

8. 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 변화

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정한 결과, 정상군 3416.32±608.85 fluorescence/min/㎖에 비하여 대조군은 4366.42±539.82 fluorescence/min/㎖로 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 2300.71±451.42 fluorescence/min/㎖, CL 투여군은 3069.39±647.93 fluorescence/

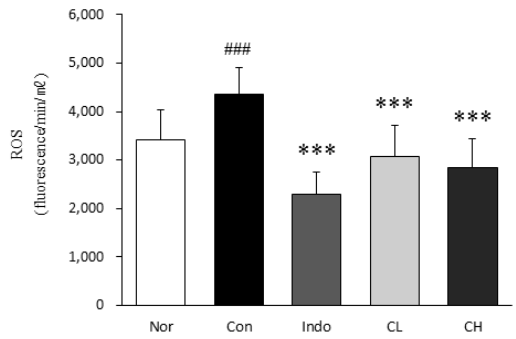

Fig. 8. Oxidative stress biomarker (ROS) in serum.
Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (###, p<0.001). *, Significantly different from the control (***, p<0.001).

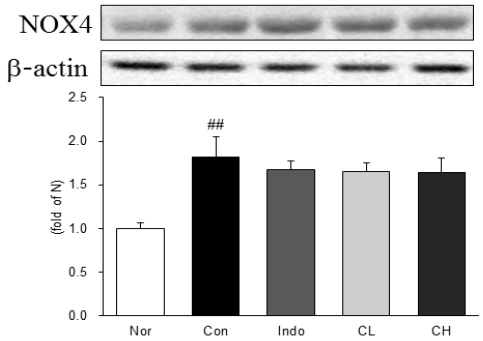

Fig. 9. Western blot analysis of NADPH oxidase 4 (NOX4) expression.
Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (##, p<0.01).

min/㎖, CH 투여군은 2839.19±591.11 fluorescence/min/㎖로 모두 유의성 ($p<0.001$) 있게 감소하였다 (Fig. 8).

9. 관절조직 내 NADPH 매개 인자 분석

1) NOX4

NOX4 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.07에 비하여 대조군은 1.82±0.23으로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.01$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.68±0.10, CL 투여군은 1.65±0.11, CH 투여군은 1.64±0.17로 모두 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 9).

2) $p47^{phox}$

$p47^{phox}$ 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.11에 비하여 대조군은 1.40±0.17로 단백질 발현이 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.10±0.10, CL 투여군은 1.31±0.17, CH 투여군은 1.22±0.17로 감소하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 10).

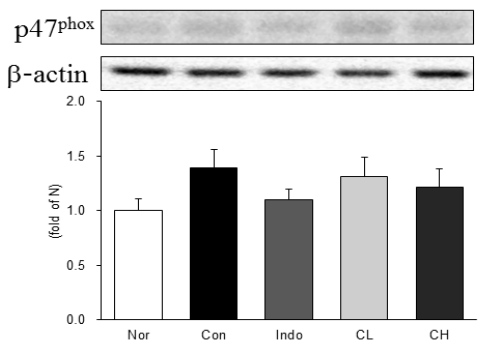

Fig. 10. Western blot analysis of $p47^{phox}$ expression.
Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups.

4) RAC1

RAC1 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.20에 비하여 대조군은 2.28±0.19로 유의성 ($p<0.01$) 있게 단백질 발현이 증가하였다. 대조군에 비하여 단백질 발현이 Indo 투여군은 1.45±0.18로 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였고, CL 투여군은 1.79±0.39, CH 투여군은 1.52±0.34로 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 11).

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.19026

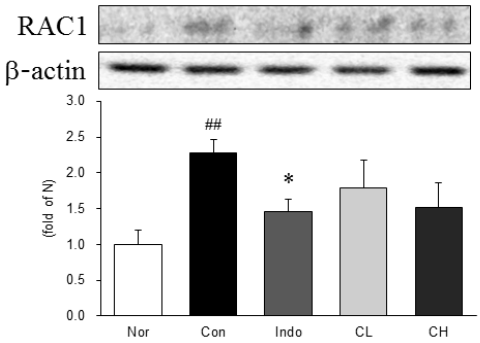

Fig. 11. Western blot analysis of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (##, p<0.01). *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

10. 관절조직 내 항산화 단백질 분석

1) Nrf2

Nrf2 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.15에 비하여 대조군은 0.77±0.07로 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 0.95±0.09, CL 투여군은 0.95±0.10, CH 투여군은 0.89±0.14로 증가하였으나 모두 유의성은 없었다 (Fig. 12).

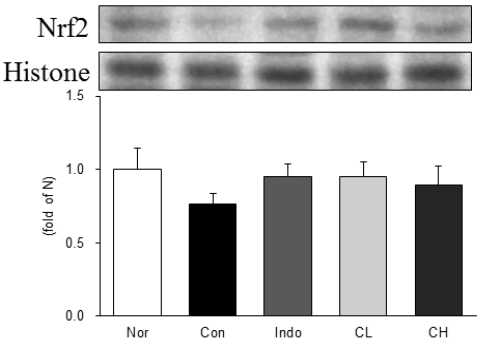

Fig. 12. Western blot analysis of nuclear factor erythroid 2 (Nrf2) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups.

2) HO-1

HO-1 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00 ± 0.16에 비하여 대조군은 0.76±0.03으로 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.06±0.06, CL 투여군은 1.04±0.09로 유의성 ($p<0.05$) 있게 증가하였고, CH 투여군은 0.96±0.06으로 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 13).

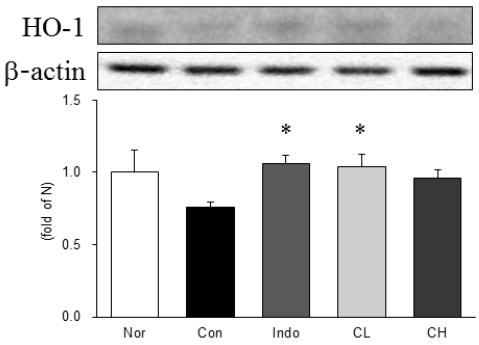

Fig. 13. Western blot analysis of glutathione heme oxygenase-1 (HO-1) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

3) SOD

SOD 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.19에 비하여 대조군은 0.62 ± 0.04로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.03±0.08, CH 투여군은 1.04±0.13으로 유의성 ($p<0.05$) 있게 증가하였고, CL 투여군은 0.95±0.14로 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 14).

4) Catalase

Catalase 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.11에 비하여 대조군은 0.98±0.05로 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.40±0.10으로 유의성 ($p<0.05$) 있게 증가하였고, CL 투여군은 1.55±0.19, CH 투여군은 1.64±0.17로 모두

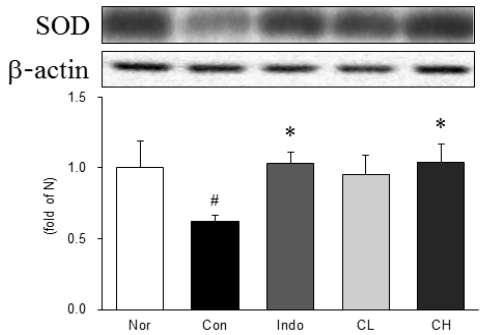

Fig. 14. Western blot analysis of superoxide dismutase (SOD) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (#, p<0.05). *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

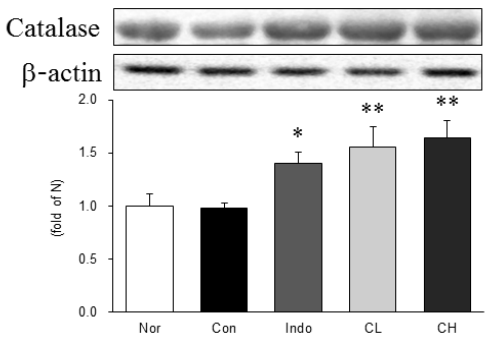

Fig. 15. Western blot analysis of catalase expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. *, Significantly different from the control (*, p<0.05 ; **, p<0.01).

유의성 (p<0.01) 있게 증가하였다 (Fig. 15).

5) GPx

GPx 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.14에 비하여 대조군은 0.80 ± 0.06으로 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.06±0.11로 단백질 발현이 유의성 (p<0.05) 있게 증가하였고, CL 투여군 0.94±0.06, CH 투여군 0.87±0.05는 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16).

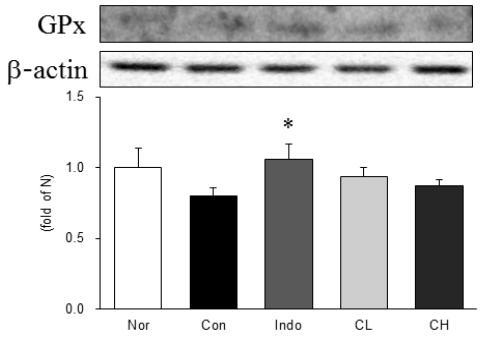

Fig. 16. Western blot analysis of glutathione peroxidase (GPx) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

11. 관절조직 내 염증성 cytokine 및 매개 인자 분석

1) NF-κBp65

NF-κBp65 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.18에 비하여 대조군은 2.30±0.51로 단백질 발현이 유의성 (p<0.01) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.14±0.20, CL 투여군은 1.01±0.20, CH 투여군은 1.02±0.11로 모두 유의성 (p<0.01) 있게 감소하였다 (Fig. 17).

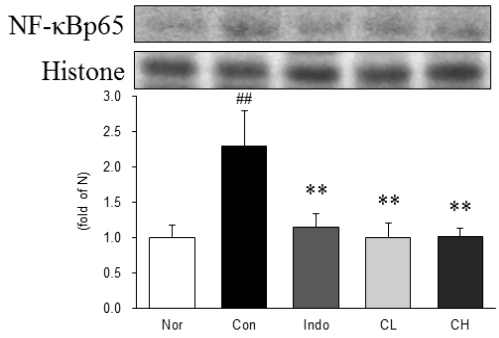

Fig. 17. Western blot analysis of nuclear factor-kappa B p65 (NF-κBp65) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (##, p<0.01). *, Significantly different from the control (**, p<0.01).

 http://dx.doi.org/10.13048/jkm.19026

2) iNOS

iNOS 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.08에 비하여 대조군은 1.86±0.23으로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.49±0.10, CL 투여군은 1.82±0.16, CH 투여군은 1.65±0.12로 모두 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 18).

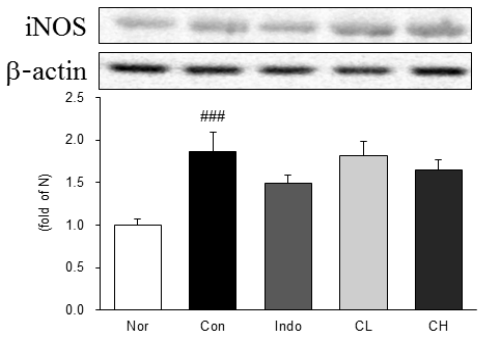

Fig. 18. Western blot analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

3) TNF-α

TNF-α 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.07에 비하여 대조군은 1.82±0.19로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.01$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.51±0.10으로 감소하였으나 유의성은 없었으며, CL 투여군은 1.26±0.19, CH 투여군은 1.28±0.22로 모두 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 19).

4) IL-1β

IL-1β 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.06에 비하여 대조군은 2.34±0.38로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.67±0.15, CL 투여군은 1.69±0.12로 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였고, CH 투여군 또한

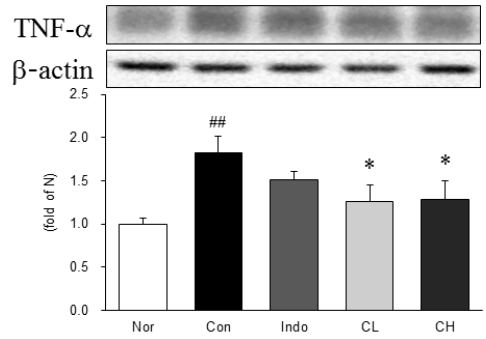

Fig. 19. Western blot analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (##, p<0.01). *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

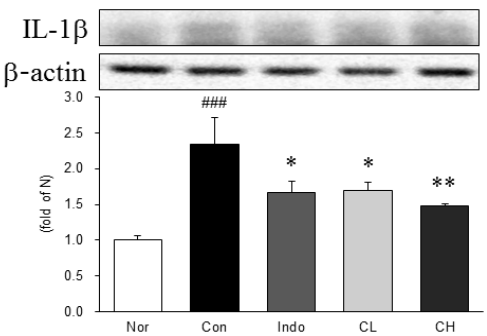

Fig. 20. Western blot analysis of interleukin-1beta (IL-1β) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (###, p<0.001). *, Significantly different from the control (*, p<0.05 ; **, p<0.01).

1.48±0.03으로 유의성 ($p<0.01$) 있게 감소하였다 (Fig. 20).

12. 관절조직 내 단백질 분해 인자 분석

1) MMP-2

MMP-2 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.05에 비하여 대조군은 1.68±0.10으로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.001$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여

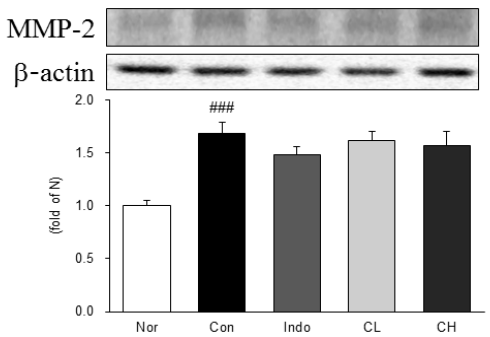

Fig. 21. Western blot analysis of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

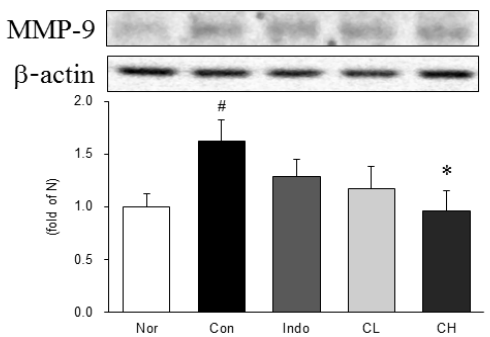

Fig. 22. Western blot analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. #, Significantly different from the normal (#, p<0.05). *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

Indo 투여군 1.48±0.08, CL 투여군 1.62±0.09, CH 투여군 1.57±0.13으로 감소하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 21).

2) MMP-9

MMP-9 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.13에 비하여 대조군은 1.62±0.20으로 단백질 발현이 유의성 ($p<0.05$) 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.28±0.17, CL 투여군은 1.17±0.21로 감소하였으나 유의성은 없었으며, CH 투여군은 0.96±0.19로 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 22).

3) TIMP1

TIMP1 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.21에 비하여 대조군은 0.88±0.08로 단백질의 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.52±0.18, CH 투여군은 1.53±0.33으로 모두 유의성 ($p<0.05$) 있게 증가하였고, CL 투여군은 1.43±0.15로 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 23).

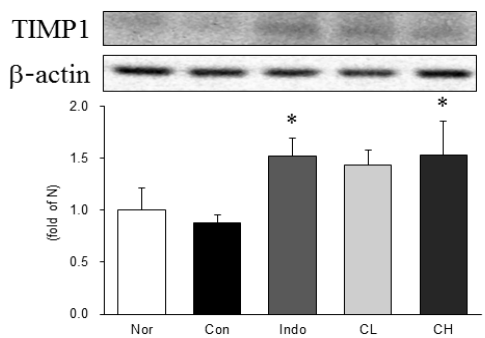

Fig. 23. Western blot analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. *, Significantly different from the control (*, p<0.05).

4) TIMP2

TIMP2 단백질 분석을 한 결과, 정상군 1.00±0.18에 비하여 대조군은 0.84±0.05로 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 Indo 투여군은 1.02±0.08, CL 투여군은 0.95±0.06, CH 투여군은 1.08±0.13으로 모두 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 24).

13. 조직학적 변화

1) H&E 염색

정상군은 활막 조직 및 연골 조직이 모두 정상적으로 나타났다. 반면에 대조군은 골관절염의 유발로

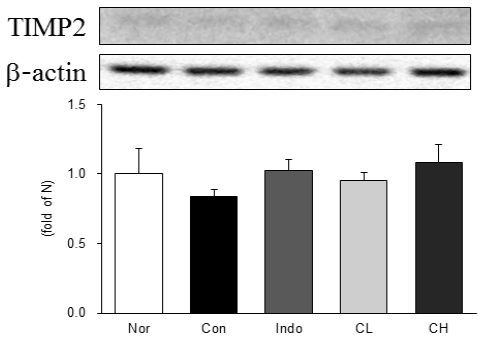

Fig. 24. Western blot analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2) expression.

Expression levels in the MIA-induced osteoarthritis rats. Refer to Table 2 for groups. All data are expressed as the means ± SEM, n=6 rats per group. There is no significant difference in the experimental groups.

인하여 활막 조직, 연골 조직의 파괴로 인하여 손상이 나타났다. 대조군과 비교하여 양성 대조군인 Indomethacin 투여군은 활막 조직과 연골 조직 손상을 회복하였으며 薑黃 추출물 50㎎/㎏ 투여군과 薑黃 추출물 100㎎/㎏ 투여군 또한 농도 의존적으로 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 회복되었다 (Fig. 25).

2) Safranin O 염색

정상군은 관절 조직과 proteoglycan이 정상적으로 보였으나 대조군은 골관절염 유발로 인하여 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 관찰되었다. 양성 대조군인 Indomethacin 투여군에서는 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 억제됨을 관찰하였으며, 薑黃 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군과 薑黃 추출물 100㎎/㎏ 투

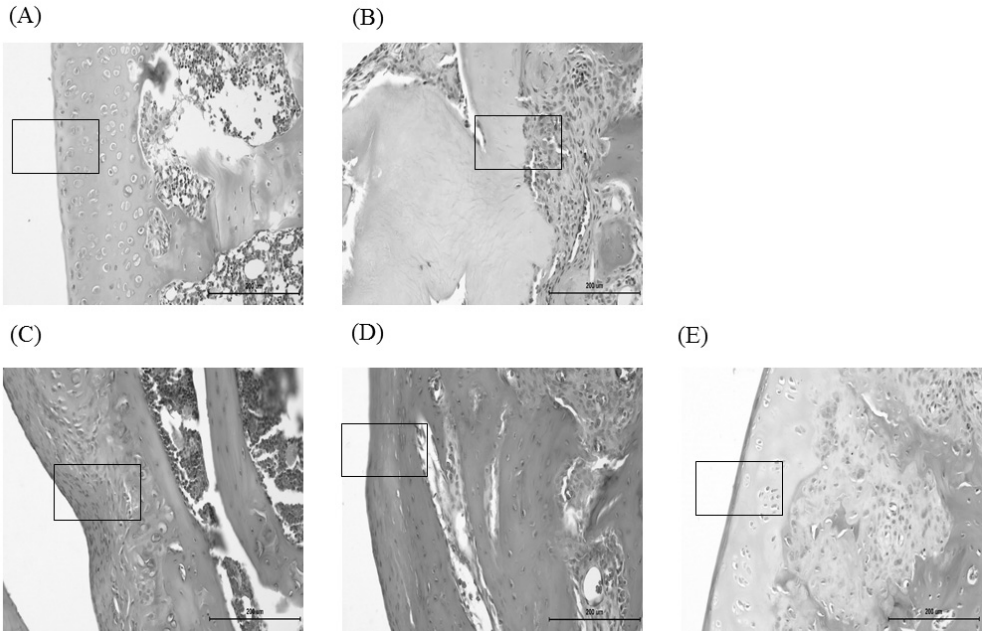

Fig. 25. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of CL and CH in MIA-induced osteoarthritis rats (H&E staining, × 200).

In the normal, synovial tissue and cartilage were well observed. In the control, most of aricular cartilage and synovial tissue were destructed. In the CL & CH, articular cartilage and synovial tissue were preserved, compared with the control. (A) Nor, (B) Con, (C) Indo, (D) CL, (E) CH. Refer to Table 2 for groups.

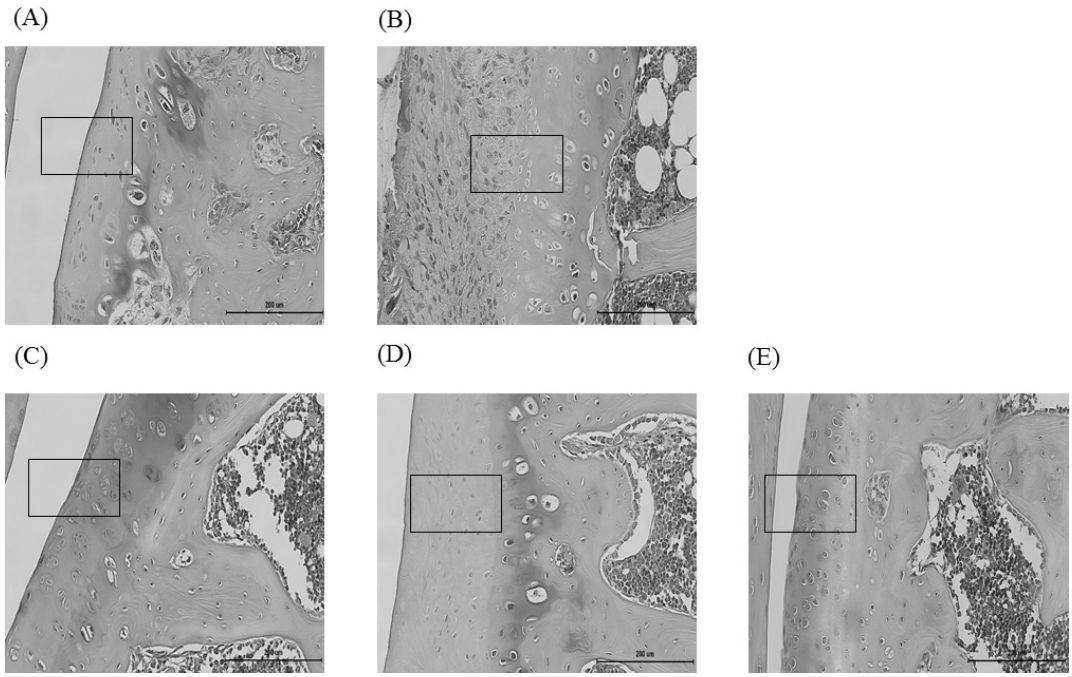

Fig. 26. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of CL and CH in MIA-induced osteoarthritis rats (Safranin O staining, × 200).

In the normal, there are much of proteoglycan around the cartilage. In the control, most of proteoglycan was broken down. In the CL & CH, proteoglycan was well preserved compared with the control. Especially, CH group showed histologically similar to normal group. (A) Nor, (B) Con, (C) Indo, (D) CL, (E) CH. Refer to Table 2 for groups.

여군 또한 대조군에 비하여 농도 의존적으로 관절 조직 및 proteoglycan의 파괴가 억제되었다 (Fig. 26).

고 찰

퇴행성 관절 질환인 골관절염은 노년층에 빈발하며 만성 통증으로 인하여 삶의 질을 저하시키는 주요한 원인이 된다[31,32]. 우리나라의 65세 이상 주민등록 인구는 2008년 약 507만명 (10.2%)이었으나 지속적으로 증가하여 2017년 8월말 기준 약 726만 명 (14.0%)에 이르러 고령 사회로 진입하게 되었으며, 이에 따라 퇴행성 질환인 골관절염에 대한 유병율이 증가될 것으로 예상된다[33].

서양의학에서 골관절염의 보존적 치료로는 아세트아미노펜, 비스테로이드성 항염증제 (NSAIDs) 등의 약물 요법과 비스테로이드성 항염증제 (NSAIDs), 코르티코스테로이드, 관절강내 하이알루론산 등의 주사 요법이 다용된다[34]. 본 연구의 양성대조군으로 설정한 indomethacin은 대표적인 NSAIDs로 골관절염, 염증성 치주질환, 강직성 척추염 등의 질환에 활용된다[35]. 하지만 NSAIDs의 경우 소화 장애, 위장관의 출혈 및 궤양, 혈압 상승, 신기능 저하 등의 부작용이 보고되고 있어 장기간 복용시 주의를 요하게 된다[36,37]. 뿐만 아니라 골관절염의 주요 환자군은 노년층으로 수술 요법에 대하여 부담을 가지는 경우가 많아 한방치료가 이러한 환자들에게 치료의 대안이 될 수 있다[38].

한의학에서 골관절염은 鶴膝風, 痺證, 歷節風, 腳氣의 범주로 보았으며, 그 원인을 風寒濕 등의 外邪로 인하여 氣血運行이 閉阻된 外因과, 노화에 따라 肝腎衰弱하여 傷骨한 內因으로 분류하여 補肝腎陰虛 및 破瘀血을 위주로 치료한다[2].

薑黃 (*Curcuma longa* rhizoma)은 性味가 辛苦, 溫한데, 辛溫의 성미는 相合하여 밖으로 風寒을 散하고 안으로 氣血을 行하게 하며, 苦溫의 성미는 相合하여 밖으로 寒濕을 祛하고 안으로 瘀血을 破하므로 祛瘀, 活絡, 行氣, 止痛의 효능을 가지며 氣滯血瘀로 인한 여러 통증에 활용된다[4]. 이러한 효능을 바탕으로 류마티스 관절염에 薑黃의 효과[11,26,27]가 이미 보고된 바 있다. 活血祛瘀藥에 속하는 薑黃 추출물의 경구투여 또한 골관절염에 양호한 효과가 있을 것으로 기대되어 MIA 유도 골관절염 Rat 모델을 이용하여 실험을 수행하였다.

먼저, 薑黃 추출물을 HPLC를 이용하여 분석하여 보았다. 薑黃 추출물을 분석한 결과 33.7분대에서 peak를 얻었고, curcumin 표준품을 분석한 결과 이와 동일한 retention time을 가지는 peak를 얻을 수 있었으며 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 薑黃 추출물의 성분 중 가장 많은 양을 차지하는 물질이 薑黃의 주요 성분으로 알려진 curcumin 임을 확인하였다. 성분 함량을 분석한 결과 薑黃 추출물은 curcumin을 0.72 mg/g 함유하고 있어 curcumin을 지표물질로 사용 가능하다고 생각한다 (Fig. 1).

薑黃 추출물의 생체 내 안전성을 확인하고자 체중 변화와 식이섭취량 측정, 혈청 내 ALT, AST, BUN, Creatinine 검사를 시행하였으며, 그 결과 薑黃 추출물은 식이에 대한 부작용이 없었으며 (Table 2), 간과 신장에 대한 약물 독성이 나타나지 않았다 (Fig 2-5).

본 연구에서는 뒷다리 체중 부하의 변화를 통하여 골관절염이 유발된 Rat의 통증 변화를 객관적으로 평가하고자 하였다. 대조군의 경우 MIA 주사 후 3주까지 지속적으로 관절염이 악화되어 정상군에 비하여 유의하게 건측 체중 부하가 증가되었다. 하지만 薑黃 추출물의 경구투여를 한 CL과 CH 투여군은 대조군에 비하여 유의하게 건측 체중 부하가 감소하였다 (Table 3). 이는 관절염을 유발시킨 환측 다리의 체중지지가 증가하였다는 것으로, 薑黃 추출물의 경구투여에 의하여 통증이 완화된 것을 의미한다. 이러한 결과는 薑黃 추출물이 골관절염의 진행을 억제하고 통증을 감소시키는 효과가 있음을 시사한다.

薑黃 추출물의 항산화능을 알아보기 위해 DPPH free radical, ABTS free radical 소거 활성을 측정하였다. 항산화 물질은 유리기와 반응을 하게 되며, 활성 radical에 전자를 공여하여 radical을 소거하는 작용은 항산화 효과, 인체의 항노화 효과의 척도로 활용된다[39]. DPPH는 비교적 안정된 free radical을 함유한 수용성 물질로서, 항산화 활성 물질과 만나게 되면 hydrazyl의 질소 원자가 전자를 공여하여 radical이 소멸되어 특유의 보라색이 탈색되는데, 이를 통하여 항산화능을 확인하게 된다[40,41]. ABTS radical 소거능은 ABTS 용액과 과황산칼륨 (Potassium persulfate)과의 반응을 통하여 생성된 ABTS 양이온이 항산화 활성 물질에 의해서 제거되면 radical 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화능을 측정하는 방법으로, DPPH radical 소거능과 유의한 상관성이 있음이 알려져 있다[42]. 본 연구에서 薑黃 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 농도 의존적으로 소거 활성이 증가하는 것으로 나타나 薑黃 추출물이 항산화 활성 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 6,7). 하지만 저농도에서는 상대적으로 낮은 수준의 항산화능을 보여 항산화 활성을 목적으로 사용시 농축을 통한 고농도의 투여가 필요할 것으로 생각된다.

활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)은 생명체의 세포대사 과정에서 지속적으로 형성이 되는 물질로, ROS가 일정 수준 이상이 되면 병리적 상태가 유발된다[43]. 이러한 ROS는 $O2^{-}$ (superoxide

radical), HO^{-} (hydroxyl radical), $H_2O_2^{-}$ (hydrogen radical), ROO^{-} (peroxyl radical) 등이 주를 이루며[44], 세균 감염시 중요한 살균 작용을 하지만, 과다 생성시 발생하는 산화적 스트레스는 염증을 악화시키고 조직에 손상을 주게 되며, 신호 전달 분자의 활성화를 통하여 세포의 사멸을 유도하게 된다[45]. 본 연구에서 혈청내 ROS를 측정한 결과 CL 투여군, CH 투여군 모두 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 8). 薑黃 추출물이 ROS의 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 앞서 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 통하여 확인된 薑黃 추출물의 항산화 활성 효과가 작용하였을 것이라 생각된다.

세포막 효소 단백질인 NADPH oxidase는 $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, small GTPase RAC1, RAC2로 구성되며, 평상시에 세포질에 존재하다가 세포가 자극을 받게 되면 $p47^{phox}$의 인산화가 이루어져 세포막 단백질 $p22^{phox}$의 SH3 domain과 결합함으로써 활성화되어 superoxide (O_2^{-})를 생성하게 된다[46,47]. NADPH oxidase 4 (NOX4)는 $p22^{phox}$의 조절에 의하여 $H_2O_2^{-}$를 과잉 생성하며, 과잉 생성된 O_2^{-}에 전자를 운반하여 H_2O_2로 전환시켜 염증반응에 관여한다[48]. 본 연구에서 NOX4, $p47^{phox}$, RAC1 단백질은 CL 투여군, CH 투여군 모두 대조군에 비하여 감소하였으며 유의성은 없었다 (Fig. 9-11). 이는 薑黃 추출물이 NADPH oxidase의 활성억제를 통하여 ROS의 생산을 억제하는 것으로 사료된다. 이러한 薑黃 추출물의 ROS 생성 억제는 산화적 스트레스로 관절 연골의 염증 및 손상을 일으키는 과정에 작용하여 그 반응을 억제함으로써 골관절염에 긍정적 작용을 할 것으로 추측된다.

염증조절인자로 작용하는 nuclear factor erythroid 2 (Nrf2)는 항산화 약물이나 산화적 자극이 세포 내로 들어오게 되면 phase II enzyme의 전사를 일으켜 세포를 산화적 스트레스로부터 보호하게 된다[49,50]. heme oxygenase는 3가지 유형으로 HO-1, HO-2, HO-3이 있으며, 그 중 HO-1은 항산화, 항염증, 세포 보호 효과가 있다고 알려져 있으며 스트레스에 반응하여 발현된다[51]. Superoxide dismutase (SOD)는 산소 대사에 의하여 생성되는 superoxide radical (O_2^{-})을 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 전환시키며[52], Catalase와 glutathione peroxidase (GPx)에 의하여 hydrogen peroxide는 다시 H_2O와 O_2로 분해하는 과정을 통하여 활성산소를 제거하여 세포 손상을 막게 된다[53,54]. 본 연구에서 시행한 검사에서 모든 항산화 단백질은 증가하였다. 특히 Catalase는 CL, CH 투여군 모두 유의하게 증가하여 가장 두드러진 변화가 나타났다. HO-1은 CL 투여군에서, SOD는 CH 투여군에서 각각 유의하게 증가하였다. Nrf2, GPx는 증가하는 경향이 나타났으나 유의성은 없었다 (Fig. 12-16). 이는 薑黃 추출물의 경구투여가 항산화 단백질을 증가시켜 염증 반응에 의한 산화적 손상을 방지하는 작용을 한다고 생각된다.

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 염증 매개물질의 생성을 조절하는 전사인자로, 정상 상태에서는 세포질에서 IκB-α 단백질과 결합하여 불활성 상태로 세포질에 존재하다가 외부자극에 의하여 I-κB가 분해되면 p65 단백질이 세포 핵 내로 이동하여 전사가 이루어지게 되고, 이 때 TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, PGE_2 등 염증매개물질을 분비하게 된다[55,56]. 그러므로 NF-κB는 염증매개 cytokine의 발현에 중요한 역할을 담당하는 경로로 알려져 있으며 NF-κB의 활성억제는 항염증 작용에서 중요한 부분이다[57]. iNOS는 과량의 NO를 생성하여 골관절염의 연골세포에서 염증성 cytokine 분비와 이화작용을 촉진하는데, 이 때 생성된 NO는 proteoglycan, collagen의 합성을 모두 억제하며 연골세포의 염증 반응을 일으킨다[58,59]. TNF-α는 여러 하위염증 매개 물질의 분비를 유발하여 염증을 확대시키고, proteoglycan의 재합성 억제 및 분해 촉진을 통하여 연골의 손상과 골관절염의 진행을 일으키게 된다[60]. IL-1β 또한 이화작용을 통하여 연골 분해를 일으키는 강력한 cytokine으로 연골 및 활막 세포로부터 PGE_2, NO 등의 염증매

개체를 생산한다[61]. 그러므로 이와 같은 염증성 매개인자 및 cytokine의 억제가 골관절염 치료의 중요한 부분이 된다[60]. 본 연구에서 NF-κBp65, iNOS, TNF-α, IL-1β는 CL 투여군, CH 투여군 모두 대조군에 비하여 감소하였으며, 특히 NF-κBp65, TNF-α, IL-1β는 유의하게 감소하였다 (Fig. 17-20). 이와 같은 결과는 薑黃 추출물이 염증 cytokine 및 매개인자의 발현을 조절하여 염증반응을 억제하는 작용을 하는 것을 알 수 있다. 즉, NF-κB의 활성을 억제하여 염증성 cytokine의 분비를 감소시킴으로써 염증으로 인한 골관절염의 통증을 감소시킬 뿐만 아니라 연골을 분해하는 이화 작용을 억제하여 골관절염의 회복에 도움을 준다고 생각된다.

기질 금속단백분해효소인 Matrix metalloproteinases (MMPs)는 연골세포, 활막세포 등에서 나오는데 과잉 발현시 염증성 관절에서 염증세포 침윤, 섬유화, 골파괴를 유발한다[62]. 특히 MMP-2와 MMP-9는 type IV collagen, proteoglycan 분해를 일으켜 골관절염을 악화시키게 된다[63,64]. 내인성 단백질 분해효소 억제제인 Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)는 MMPs의 활성을 저해시키는데 MMPs의 활성 조절은 관절염 치료에서 중요한 부분이다[62]. TIMPs는 현재 4종류가 알려져 있으며 그 중 TIMP1은 주로 MMP-9에, TIMP2는 주로 MMP-2에 작용하게 된다[65]. 본 연구에서 MMP-2, MMP-9는 CL 투여군, CH 투여군 모두 대조군에 비하여 감소하였으며, 특히 MMP-9는 CH 투여군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 21,22). TIMP1, TIMP2는 CL 투여군과 CH 투여군 모두 대조군에 비하여 증가하였으며, 특히 TIMP1은 CH 투여군에서 유의하게 증가하였다 (Fig. 23,24). 이는 薑黃 추출물이 TIMPs를 증가시켜 MMPs을 억제하는 것으로 생각되며, 특히 고농도 경구투여시 TIMP1을 증가시켜 MMP-9를 감소시키는 과정에 더욱 유의하게 작용하는 것으로 보인다.

조직학적 변화를 관찰하기 위하여 H&E, Safranin O 염색을 진행하였다. 그 결과 대조군에서는 활막조직과 연골조직의 손상, proteoglycan의 파괴 등이 관찰되었으나, CL 투여군과 CH 투여군에서는 농도의 존적으로 활막 조직과 연골 조직의 회복 및 proteoglycan의 파괴 억제를 관찰할 수 있었다 (Fig. 25,26). 따라서 薑黃 추출물이 관절 및 연골조직의 손상을 억제하고 관절의 회복을 돕는 효과가 있다고 생각된다.

이상의 실험 결과를 종합하면 薑黃 추출물은 항산화 작용과 염증성 cytokine 및 매개인자들의 조절을 통한 항염증 작용이 있었다. 즉, HO-1, SOD, Catalase 등의 항산화 효소를 증가시켜 ROS를 유의하게 감소시킴으로써 산화적 스트레스로 인한 관절 연골의 손상을 억제시켰다. 또한 ROS의 감소는 NF-κB의 활성화를 유의하게 조절하여 TNF-α, IL-1β, iNOS를 감소시켜 염증반응을 억제하는데 주요하게 작용하였다. 또한 TIMP1을 유의하게 증가시킴으로써 MMP-9의 연골세포 침윤, proteoglycan 파괴를 억제하여 골관절염의 진행을 억제하고 관절 연골을 보호하는 효과가 있었다 (Fig. 27). 이러한 결과를 바탕으로 薑黃 추출물의 경구투여가 MIA 유도 Rat 모델에서 골관절염의 연골 손상 억제 및 회복에 유의한 효과가 있다고 생각한다.

본 연구는 임상에서 다용되는 薑黃의 작용을 MIA 유도 골관절염 Rat 모델을 통하여 규명하고자 하였다. 그 결과 항산화 효과 및 NF-κB 신호전달경로에 작용하는 항염증 효과에 의하여 골관절염의 연골 손상을 억제함을 확인하였다. 하지만 본 연구는 薑黃을 30% EtOH로 추출하여 사용하였기에 curcumin을 단일 추출한 것과 비교하여 어떤 성분이 구체적으로 작용했는지 알기 어렵다는 제한점이 있다. 한의학에서는 여러 한약재를 조합하여 처방으로 사용하는데, 본 연구는 단일 약재로 진행한 것으로 한의학적 관점을 반영시키기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 보며, 향후 한약 처방의 약리 기전 연구에 기초 자료가 될 수 있을 것이라 기대한다.

이상의 연구결과로 판단하건대 薑黃 추출물은 항

산화, 항염증 효과가 있어 MIA 유도 골관절염 Rat 모델에서 유의한 효과가 실험적으로 확인되었으며, 골관절염에 활용할 수 있는 가능성 및 그 근거을 보여 주었다고 생각된다.

결 론

薑黃이 MIA 유도 골관절염에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 薑黃을 이용하여 동물실험을 한 결과이다.
2. 薑黃은 간, 신장 독성을 보이지 않아 비교적 안전한 것으로 생각된다.
3. 薑黃은 항산화 단백질의 생성을 증가시켜 ROS 생성을 억제하는 기전을 통하여 항산화 효과가 관찰되었다.
4. 薑黃은 NF-κB의 활성을 조절하여 염증성 cytokine 및 매개 인자를 억제하는 기전을 통하여 항염증 효과를 보였다.
5. 薑黃은 조직학적 분석 결과 활막 조직, 연골 조직의 손상과 proteoglycan의 파괴가 농도 의존적으로 억제됨이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 薑黃은 항산화 작용, 항염증 작용이 있으며, 이를 통하여 연골 손상 억제 및 회복을 촉진하였다. 향후 다양한 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 이러한 결과는 薑黃의 골관절염 치료 기전을 연구하는 중요 자료로 활용될 것으로 생각한다.

참고문헌

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine 4th ed. Seoul: Koonja publisher. 2015:102-51.
2. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. Acupuncture Medicine. Seoul:Hanmibook. 2016:537-68.
3. Harrison's Principles of Internal Medicine Edit committee of the Korean Association of Internal Medicine. Harrison's Principles of Internal Medicine 18th edition(2). Seoul:MIP. 2013:2782.
4. Herbal medicine editorial committee of Korean medicine college. Herbal medicine. Seoul: Younglimsa. 2011:454-5.
5. Jung TS, Choi CW. The Effect of the Curcumae Longae Rhizoma (CLR) Extract on the Hepatocellular Carcinogenesis and Acute Liver Damage Induced by Diethylnitrosamine (DENA) and CCl4 in Rats. Herbal Formula Science. 2014;22(1):177-92.
6. Oh JS, Yang SY, Kim MH, Namgung O, Park YC. Effects of Root of Curcumin longa on LPS-induced Lung Injury. J Korean Oriental Med. 2013;34(1):89-102.
7. Kim SD. Effects of Curcuma longa Rhizoma (CLR) on chronic renal failure in rats. Dongshin University Graduate School. 2008.
8. Lee JH, Kim JH, Park SY, Choi JH. Effects of Curcuma longa Rhizoma on Asthma induced intra-nasal instillation of Ovalbumin in Mice. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2008;21(3):20-35.
9. Seong KW. The Effect of Oral Curcuma longa ingestion on the gene expression in a Rat Model of Benign Prostatic Hyperplasia using microarray analysis. Kyunghee University Graduate School. 2012.
10. Lee JH. Effects of Curcumae Longae Rhizoma pharmacopuncture on MIA-induced Osteoarthritis Rats. Daegu Haany University Graduate

School. 2018.
11. Lee OJ, Lee DG, Lee JH, Lee JH, Lee SH, Park GH, et al. Effects of Curcuma longa LINNE Pharmacopuncture at ST36 on Adjuvant Induced Arthritis in Rats. The Acupuncture. 2013;30(4):95-105.
12. Yang H, Huang S, Wei Y, Cao S, Pi C, Feng T, et al. Curcumin Enhances the Anticancer Effect Of 5-fluorouracil against Gastric Cancer through Down-Regulation of COX-2 and NF-κB Signaling Pathways. J Cancer. 2017;8(18): 3697-706.
13. Haryuna TS, Munir D, Maria A, Bashiruddin J. The Antioxidant Effect of Curcumin on Cochlear Fibroblasts in Rat Models of Diabetes Mellitus. Iran J Otorhinolaryngol. 2017;29(93):197-202.
14. Wang X, Hang Y, Liu J, Hou Y, Wang N, Wang M. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell. Oncol Lett. 2017;13(6):4825-31.
15. Mohammadi S, Karimzadeh Bardei L, Hojati V, Ghorbani AG, Nabiuni M. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin on Insulin Resistance Index, Levels of Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Liver Histology in Polycystic Ovary Syndrome-Induced Rats. Cell J. 2017; 19(3):425-33.
16. 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.
17. Ratanavaraporn J, Soontornvipart K, Shuangshoti S, Shuangshoti S, Damrongsakkul S. Localized Delivery of Curcumin from Injectable Gelatin/Thai Silk Fibroin Microspheres for Anti-inflammatory Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model. Inflammopharmacology. 2017;25(2):211-21.
18. Park S, Lee LR, Seo JH, Kang S. Curcumin and Tetrahydrocurcumin Both Prevent Osteoarthritis Symptoms and Decrease the Expressions of Pro-inflammatory Cytokines in Estrogen -deficient Rats. Genes Nutr. 2016;11:2.
19. Niazvand F, Khorsandi L, Abbaspour M, Orazizadeh M, Varaa N, Maghzi M, et al. Curcumin-loaded Poly Lactic-co-glycolic Acid Nanoparticles Effects on Mono-iodoacetate -induced Osteoarthritis in Rats. Vet Res Forum. 2017;8(2):155-61.
20. Li XS, Chen H, Zhen P, Li SS, Zhou SH, Tian Q, et al. JAK2/STAT3 Signal Pathway Mediating Curcumin in Cartilage Cell Metabolism of Osteoarthritis. Zhongguo Gu Shang. 2016;29(12):1104-9.
21. Wang J, Ma J, Gu JH, Wang FY, Shang XS, Tao HR, et al. Regulation of Type II Collagen, Matrix Metalloproteinase-13 and Cell Proliferation by Interleukin-1β Is Mediated by Curcumin via Inhibition of NF-κB Signaling in Rat Chondrocytes. Mol Med Rep. 2017; 16(2):1837-45.
22. Li X, Feng K, Li J, Yu D, Fan Q, Tang T, et al. Curcumin Inhibits Apoptosis of Chondrocytes through Activation ERK1/2 Signaling Pathways Induced Autophagy. Nutrients. 2017;9(4):414.
23. Henrotin Y, Gharbi M, Dierckxsens Y, Priem F, Marty M, Seidel L, et al. Decrease of a Specific Biomarker of Collagen Degradation in

Osteoarthritis, Coll2-1, by Treatment with Highly Bioavailable Curcumin during an Exploratory Clinical Trial. BMC Complement Altern Med. 2014;14:159.

24. Nakagawa Y, Mukai S, Yamada S, Matsuoka M, Tarumi E, Hashimoto T, et al. Short-term Effects of Highly-bioavailable Curcumin for Treating Knee Osteoarthritis: a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Prospective study. J Orthop Sci. 2014;19(6):933-9.
25. Haroyan A, Mukuchyan V, Mkrtchyan N, Minasyan N, Gasparyan S, Sargsyan A, et al. Efficacy and Safety of Curcumin and Its Combination with Boswellic Acid in Osteoarthritis: a Comparative, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):7.
26. Ramadan G, Al-Kahtani MA, El-Sayed WM. Anti-inflammatory and Anti-oxidant Properties of Curcuma longa (turmeric) versus Zingiber officinale (Ginger) Rhizomes in Rat Adjuvant -induced Arthritis. Inflammation. 2011;34(4): 291-301.
27. Funk JL, Oyarzo JN, Frye JB, Chen G, Lantz RC, Jolad SD, et al. Turmeric Extracts Containing Curcuminoids Prevent Experimental Rheumatoid Arthritis. J Nat Prod. 2006;69(3): 351-5.
28. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature. 1958; 181(4617):1199–200.
29. Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim BS. Quantitative Analysis of (+)-Catechin, Paeoniflorin, and Paeonol in Moutan Radicis Cortex and Its Processed Products. Kor. J. Pharmacogn. 2016;47(3):237-45.
30. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med. 1994;16(2):149-56.
31. Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PW, et al. The Effects of Specific Medical Conditions on the Functional Limitations of Elders in the Framingham Study. Am J Public Health. 1994;84(3):351–8.
32. Felson DT, Zhang Y. An Update on the Epidemiology of Knee and Hip Osteoarthritis with a View to Prevention. Arthritis Rheum. 1998;41(8):1343-55.
33. Ministry of the Interior and Safety. Population census. [cited 2018 Mar 05]. Available from: URL: http://www.mois.go.kr/frt/bbs/type010/commonSelectBoardArticle.do?bbsId=BBSMSTR_000000000008&nttId=59453.
34. Jeon MH, Kim MH. Effect of Hijikia fusiforme Fractions on Proliferation and Differentiation in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. Journal of Life Science. 2011;21(2):300-8.
35. Kang YG, Nam JH, Lee KS. The Effect of Indomethacin on the Matrix Metalloproteinases in Canine Permanent Tooth Eruption. Korean J Orthod. 2006;36(2):91-102.
36. Kim HA. Pharmacological Treatment of Osteoarthritis. J. of Korean Orthopaedic Research Society. 2010;13(1):16-22.
37. Korean Knee Society Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Guidelines for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. J Korean Knee Soc. 2010;22(1):69-74.
38. Park SW, Kim YS, Lee DH, Kwon YB, Park JY, Lee SY, et al. Efficacy and Safety of

HT008 and Glucosamine Sulfate in the Treatment of Knee Osteoarthritis : A Randomized Double-blind Trial. Kor. J. Herbology. 2014;29(4):45-52.
39. Ahn SI, Bok JH, Son JY. Antioxidative Activity and Nitrite-scavenging Abilities of Some Phenolic Compounds. Korean J. Food Cookery Sci. 2007;23(1):19-24.
40. Lee JA, Jung DS. Screening of the Antioxidant and Anti-elastase Activities for the Extracts of Jeju Endemic Plants. Journal of Research in Education & Science. 2011;13(2):249-69.
41. Kim SJ, Kim HJ, Park JC. DPPH Radical Scavenging Effects of the Aerial Parts of Fagopyrum esculentum and Isolation of Bioactive Flavonoids. Herbal formula science. 2004;12(1):255-62.
42. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. Antioxidant Activity in Water and Methanol Extracts from Korean Edible Wild Plants. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40(1):29-36.
43. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev. 1998; 78(2):547-81.
44. McCord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. Am J Med. 2000;108(8): 652-9.
45. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1): 245-313.
46. Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The Superoxide -generating Oxidase of Phagocytic Cells. Physiological, Molecular and Pathological Aspects. Eur J Biochem. 1991;201(3):523-46.
47. Vignais PV. The Superoxide-generating NADPH Oxidase: Structural Aspects and Activation Mechanism. Cell Mol Life Sci. 2002;59(9): 1428-59.
48. Radermacher KA, Wingler K, Kleikers P, Altenhöfer S, Hermans JJR, Kleinschnitz C, et al. The 1027th Target Candidate in Stroke: Will NADPH Oxidase Hold Up?. Exp Transl Stroke Med. 2012;4:1-11.
49. Jin BM, Lee MK, Lee JS, Hyun KY. Anti-inflammatory Effects of Korean red ginseng Extract in formalin-induced Orofacial Pain in Rats. Journal of the Korea Academia -Industrial cooperation Society. 2014;15(9): 5708-15.
50. Lim JS, Ahn KY. Potassium Depletion Upregulates Expression of Nrf2 Transcription Factor in Rat Kidney. Korean J Nephrol. 2011;30(3):239-45.
51. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, Mol WM, Weimar W, et al. 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;14:3278–87.
52. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Superoxide Dismutase Is Dispensable for Normal Animal Lifespan. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109(15):5785-90.
53. Preiser JC. Oxidative Stress. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2012;36(2):147-54.
54. 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.

55. Park SH, Lee HJ, Ryu JH, Lee SY, Shin HD, Hong JH, et al. Effects of Silibinin and Resveratrol on Degradation of IκB and Translocation of NF-κB p65 Induced by Tumor Necrosis Factor-α in Cultured Airway Epithelial Cells. Yakhak Hoeji. 2014;58(1):1-6.
56. Asagiri M, Takayanagi H. The Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation. Bone. 2007;40(2):251-64.
57. Lee SM, Kim YK, Hwang YH, Lee CH, Lee HS, Lee CT, et al. Role of PI3K/Akt Pathway in the Activation of IκB/NF-κB Pathway in Lung Epithelial Cells. Tuberculosis and Respiratory Diseases. 2003;54(5):551-62.
58. Abramson SB. Osteoarthritis and Nitric Oxide. Osteoarthritis Cartilage. 2008;16:15-20.
59. 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. 2004;75(19):2257-67.
60. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Crucial Role of the Interleukin-6/interleukin-17 Cytokine Axis in the Induction of Arthritis by Glucose -6-phosphate Isomerase. Arthritis Rheum. 2008; 58(3):754-63.
61. Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Senolt L. Increased Level of Cytokines and Matrix Metalloproteinases in Osteoarthritic Subchondral Bone. Cytokine. 2007;38(3):151-6.
62. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity?. Oral Dis. 2000; 6(3):136-7.
63. 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.
64. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.
65. Hayakawa T. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and their Cell Growth-promoting Activity. Cell Struct Funct. 1994;19(3):109-14.
66. Kwon OJ, Kim MY, Shin SH, Lee AR, Lee JY, Seo BI, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Rhei Rhizoma and Coptidis Rhizoma Mixture on Reflux Esophagitis in Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2016:1-13.

ORCID

김영준 https://orcid.org/0000-0001-8031-9940