

독활기생탕이 MIA 유도 골관절염 랫트에 미치는 영향

나복연 · 이상훈 · 김영준 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of *Dokhwalgisaeng-tang* on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats

Bok-Yeon Na, K.M.D., Sang-Hoon Lee, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.
Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives To evaluate whether *Dokhwalgisaeng-tang* (DGT) reduces progression of disease in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis animal model.

Methods Osteoarthritis was induced by intra-articular injection of MIA in rats. DGT was orally administered for 14 days at low (240 mg/kg) or high (479 mg/kg) doses, with indomethacin (2 mg/kg) used as a positive control. Outcome measures included hind limb weight-bearing distribution, oxidative stress markers, inflammatory cytokines, cartilage matrix components, matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), and histopathological changes in joint cartilage.

Results DGT significantly improved hind limb weight-bearing distribution in MIA-induced osteoarthritic rats, suggesting pain relief. It dose-dependently reduced serum reactive oxygen species and significantly decreased malondialdehyde levels in serum and joint tissue. DGT also attenuated inflammatory responses by reducing serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels. In joint tissues, DGT suppressed inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β expression, which was associated with inhibition of nuclear factor- κ B and p38 signaling pathways. In addition, DGT regulated nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX)-related proteins, including NOX2, p22^{phox}, and p47^{phox}, supporting its antioxidative and anti-inflammatory effects. High-dose DGT preserved cartilage matrix components, maintaining aggrecan and glycosaminoglycan levels relative to controls. It also inhibited cartilage-degrading MMPs, including MMP-1, MMP-2, MMP-8, and MMP-13, while modulating TIMP-3. Histopathological analysis showed reduced cartilage erosion and proteoglycan loss in DGT-treated rats.

Conclusions DGT showed protective effects against MIA-induced osteoarthritis by reducing oxidative stress and inflammation and preserving cartilage integrity. (*J Korean Med Rehabil* 2026;36(2):1-21)

RECEIVED March 16, 2026

REVISED March 31, 2026

ACCEPTED April 2, 2026

CORRESPONDING TO

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

TEL (054) 281-0055

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2026 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Dokhwalgisaeng-tang*, Osteoarthritis, Monosodium iodoacetate, Anti-inflammatories, Antioxidant

서론»»»»

골관절염(osteoarthritis)은 가장 흔한 형태의 관절염으

로, 관절 연골의 국소적인 파괴, 인접한 뼈의 과증식 반응으로 인한 골극 형성과 연골하골의 경화, 다양한 정도의 활막 염증, 관절막 비후, 인대 및 반월 연골판 등 주

위 조직의 손상을 특징으로 한다^{1,2)}.

골관절염은 관절 연골의 진행성 퇴행, 활막 염증, 골극 형성 등을 특징으로 하는 대표적인 만성 퇴행성 관절 질환으로, 고령화와 비만 인구 증가에 따라 유병률과 사회경제적 부담이 지속해서 증가하고 있다³⁻⁵⁾.

증상을 완화하고 연골 구조를 변화시키기 위해 다양한 치료가 시도되었으나 만족스러운 효과가 입증된 것은 없으며, 여러 임상 지침에 따르면 무릎 골관절염의 비수술적 치료로 운동과 체중 관리, 생체역학적 중재, 비스테로이드성 항염증제, 관절 내 코르티코이드 주사 치료가 권장된다⁶⁻⁹⁾. 그러나 이러한 약물들은 위장관 출혈, 간 독성, 신기능 장애, 면역 기능 저하 등의 부작용을 동반할 수 있어 장기간 투여에는 제한이 따른다^{10,11)}. 따라서 보다 효과적이고 안전한 치료제나 치료법이 필요한 실정이다.

독활기생탕(獨活寄生湯, *Dokhwalgisaeng-tang*, DGT)은 孫思邈의 『備急千金要方』¹²⁾ 중 卷二十七 諸風方に 수록되어 있는 처방으로, 『東醫寶鑑』¹³⁾에서는 “治肝腎虛弱筋攣 骨痛 脚膝偏枯 緩弱冷痺”라 하여 근골격계의 강직과 통증뿐만 아니라 하지의 무력감 및 냉비 증상을 수반하는 만성 퇴행성 질환에 활용되는 처방으로 알려져 있다. DGT의 근골격계 질환에 대한 효능은 기존의 임상증례 보고^{14,15)} 및 고찰 연구¹⁶⁾를 통해 일부 보고된 바 있으나, 특정 병태 모델에서의 분자 생물학적 기전 연구는 여전히 미비하다. 특히 monosodium iodoacetate (MIA)로 유도된 골관절염 모델에서 DGT의 항염증 및 연골 보호 효과에 대한 체계적인 검증은 부족한 상태이다.

이에 본 연구에서는 MIA 유도 골관절염 rat 모델을 활용하여 DGT 경구 투여가 통증 완화(뒷다리 체중 부하, 산화적 스트레스 억제, 염증 관련 인자 및 콜라겐 분해 효소 발현에 미치는 영향을 다각도로 평가함으로써, DGT의 골관절염 치료 효과와 기전을 알아보고자 한다.

재료 및 방법 >>>>

1. 재료

1) 실험 시약

본 실험에서 사용된 gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, quercetin, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, potassium persulfate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), MIA, indomethacin, phenyl methyl sulfonyl fluoride는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Sodium carbonate와 potassium acetate는 Daejung chemicals & metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서 구입하였으며, aluminum chloride와 L-(+)-ascorbic acid는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid와 protease inhibitor mixture는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였으며, pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membranes과 ECL western blotting detection reagents는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, Bucks, UK)에서 구입하였고, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, phosphate-buffered saline (PBS)는 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였다. Isoflurane은 Troikaa Pharmaceuticals Ltd. (Ahmedabad, Gujarat, India)에서 구입하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, SC-365062), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2, SC-130543), p22^{phox} (SC-271968), p47^{phox} (SC-17845), phosphatidylinositol 3-kinase p85 α (PI3K, SC-1637), nuclear factor kappa B p65 (NF- κ B p65, SC-8008), phospho-nuclear factor kappa B p65 (p-NF- κ B p65, SC-136548), inhibitor of nuclear factor kappa B- α (I κ B- α , SC-1643), phospho-inhibitor of nuclear factor kappa B- α (p-I κ B- α , SC-8404), tumor necrosis factor- α (TNF- α , SC-133192), interleukin-1 β (IL-1 β , SC-12742), matrix metalloproteinase-1

(MMP-1, SC-21731), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2, SC-13595), matrix metalloproteinase-8 (MMP-8, SC-514803), tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1, SC-21734), tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-3 (TIMP-3, SC-373839)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구매하였으며, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, ab39012)는 Abcam (Cambridge, Cambs, UK)에서 구매하였다. Phospho-phosphatidylinositol 3-kinase p85/p55 (p-PI3K, #4228), Akt (#9272), phospho-Akt (p-Akt, #9275), p38 mitogen-activated protein kinase (p38, #9212), phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38, #9211), inducible nitric oxide synthase (iNOS, #68186), cyclooxygenase-2(COX-2, #12282)는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구매하였다. 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2) 실험 동물

7주령(220~240 g) 수컷 Sprague-Dawley rat을 DBL Co., Ltd. (Eumseong, Korea)에서 구입한 후, 일주일간 동물 사육실 환경에 적응시켰다. 사육 환경은 온도 22 ± 2 °C, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암 주기 12시간(light:dark cycle)으로 유지되었으며, 실험 전까지 고형사료(Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 제공하였다. 동물 실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적 관리를 위해 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회(institutional animal care and use committee)로부터 승인(DHU2024-049)을 받아 진행하였다.

3) 실험 기기

본 실험에서 전자저울(CAS Co. Ltd., Yangju, Korea), 열탕 추출기(DWT-1800T; Daewoong Bio, Inc., Hwasung, Korea), 회전식 감압 농축기(N-1100; EYELA, Tokyo, Japan), 동결건조기(FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco Corp., Kansas City, MO, USA), analog vortex mixer (VXMNAL, OHAUS Corp., Parsippany, NJ, USA), incapitance tester (Ser No. 01/45/25; Linton Instruments, Palgrave, UK), centrifuge (GYROZEN Co. Ltd., Seoul, Korea), tissue grinder (BioSpec Products, Inc. Bartlesville, OK, USA), microplate reader (Infinite

M200 pro; Tecan, Zürich, Switzerland), ELISA kit (TNF- α : K0331196P, IL-6: K0331229P; Komabiotech, Inc., Seoul, Korea), UV-VIS microplate reader (Infinite F200 pro; Tecan), Vilber Fusion Solo X (Vilber Lourmat Sté, Collégien, France), Evolution Capt software (ver. 18.12; Vilber Lourmat Sté)를 사용하였다.

4) 실험 약재

본 실험에 사용된 DGT은 獨活, 當歸, 白芍藥, 桑寄生 2.8 g, 熟地黃, 川芎, 人蔘, 白茯苓, 牛膝, 杜沖, 秦艽, 細辛, 防風, 肉桂 2 g, 甘草 1.2 g, 生薑 4 g으로 구성되었으며, 모든 약제는 웅기한약국(Daegu, Korea)에서 구입하였다.

DGT 8첩 분량에 10배수의 증류수를 가하여 100 °C에서 2시간 동안 열탕 추출하였다. 이후 회전식 감압 농축기로 농축한 뒤, 동결건조기를 사용해 완전히 건조하여 파우더 37.26 g을 얻었다(수율 12.8%).

DGT의 투여용량 계산은 다음과 같다. DGT의 1첩 무게는 36.4 g이며, 이를 열탕 추출 후, 동결 건조하면 약 4.66 g의 파우더가 얻어지는데(수율 12.8%), 이를 60 kg 성인의 하루 복용량으로 가정하였다. 실험에 사용된 rat의 체표면적 환산 계수인 6.17을 적용하여 복용량을 계산한 결과, 1첩 분량은 0.479 g/kg (4.66 g/60 kg $\times$ 6.17)로 고농도(DGTH)로 하였으며, 반첩 분량은 저농도(DGTL)로 설정하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 투여, 골관절염 유발 및 군 분리

본 실험에서 실험군은 총 5개의 군으로 아무런 처치를 하지 않은 정상군(normal), MIA로 골관절염을 유발한 후 증류수를 경구 투여한 대조군(control), MIA로 골관절염을 유발한 후 indomethacin 2 mg/kg body weight 경구 투여한 양성 대조군(INDO), MIA로 골관절염을 유도한 후 DGT 240 mg/kg body weight 경구 투여한 실험군(DGTL), MIA로 골관절염을 유발한 후 DGT 479 mg/kg body weight 경구 투여한 실험군(DGTH)으로 구성하였다(Fig. 1).

정상군을 제외한 모든 동물은 골관절염 유발을 위해

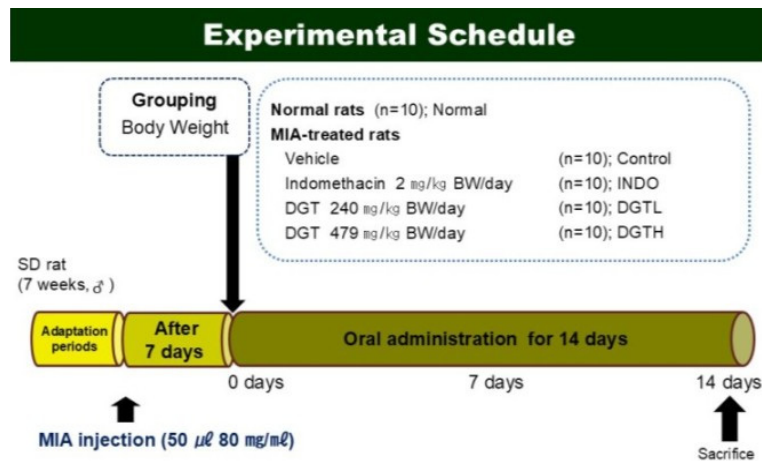


Fig. 1. Experimental schedule. MIA: monosodium iodoacetate, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*. INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SD: sprague-dawley.

오른쪽 무릎 주변의 털을 제모한 후, 31 G insulin 주사기(8 mm; Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 80 mg/mL의 MIA를 50 μ L씩 오른쪽 무릎 관절강에 주입하였다.

골관절염 유발 후 1주일인 지난 시점에서 뒷다리 체중 부하를 측정하여 유발 정도를 확인한 뒤, 골관절염이 유발된 동물만 선별하여 사용하였다. 각 군은 뒷다리 체중 부하 값의 평균에 유의미한 차이가 없도록 각 군별 10마리씩 군 분리를 하였으며, 대조군과 실험군은 매일 일정한 시간에 존대를 이용하여 증류수 혹은 약물을 경구 투여하였다.

2) 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법¹⁷⁾을 이용해 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. 이를 위해, 각 농도로 희석한 DGT 100 μ L와 7.5% sodium carbonate 400 μ L, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L를 e-tube에 넣고 혼합한 후, 실온에서 차광 상태로 30분 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 microplate reader로 765 nm에서 흡광도를 측정하여, 표준 곡선을 이용해 mg (gallic acid equivalents, GAE)/g으로 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride 비색법¹⁸⁾을 사용하여 quercetin을 표준물질로 측정하였다. 각 농도로 희석한 DGT 100 μ L에 증류수 560 μ L, 1 M potassium acetate solution 20 μ L, 10% aluminum chloride sol-

ution 20 μ L, methanol 300 μ L를 e-tube에 혼합하여 넣은 후, 실온에서 차광 상태로 30분 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준 곡선을 통해 mg (quercetin equivalents, QE)/g으로 환산하였다.

3) DPPH 자유 라디칼 소거능 측정

DPPH 자유 라디칼 소거능은 Blois¹⁹⁾의 방법을 사용하여 측정하였으며, 양성 대조군으로 L-(+)-ascorbic acid를 사용하였다. 96-well plate에 농도별로 희석한 DGT 또는 L-(+)-ascorbic acid 100 μ L와 60 μ M DPPH 용액 100 μ L를 분주한 후, 실온에서 차광 상태로 30분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 아래 식을 통해 자유 라디칼 소거능을 계산하여 50% 소거능을 나타내는 농도를 IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) 값으로 나타냈다.

DPPH free radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{blank}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample}: absorbance of sample, OD_{blank}: absorbance without sample

4) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등²⁰⁾의 방법을 사용하여 측정하였으며, 양성 대조군으로 L-(+)-ascorbic acid를 사용하였다. 2.4 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS 시약을 혼합하여 실온에서 약 16시간 동안 차광 상태로 반응시켜 ABTS⁺를 생성하였다. 이후 microplate reader를 사용하여 30 °C, 415 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 ethanol로 조정하였다. 96-well plate에 농도별로 희석한 DGT 또는 L-(+)-ascorbic acid 5 µL를 분주하고 ABTS 용액 95 µL를 첨가한 뒤, 실온에서 차광 상태로 15분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 microplate reader로 30 °C, 415 nm에서 흡광도를 측정하였고, 아래 식을 통해 라디칼 소거능을 계산하여 50% 소거능을 나타내는 농도를 IC₅₀ 값으로 표시하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{blank}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample}: absorbance of sample, OD_{blank}: absorbance without sample

5) 뒷다리 체중 부하 측정

측정은 총 3회 진행되었으며, DGT를 경구 투여하기 전인 0일과 DGT를 경구 투여한 후 7일, 14일에 각각 실시하였다. Incapacitance tester를 사용하여 쥐가 자연스럽게 서 있을 때 오른쪽과 왼쪽 뒷다리의 무게(g)를 측정하였다. MIA에 의해 골관절염이 유도되면 rat은 MIA를 투여하지 않은 왼쪽 뒷다리에 의지하여 tester holder 안에 서게 된다. 이때 왼쪽과 오른쪽 각각의 뒷다리 무게를 측정하여 기록하였다.

실험 결과는 왼쪽 뒷다리(정상 뒷다리)의 체중 부하량을 기준으로 골관절염이 유도된 오른쪽 뒷다리의 체중 부하량을 나누어 체중 부하 비율(%)을 평가하였다. 이후 정상군의 평균값을 100으로 설정하여 각 실험군의 체중 부하 비율을 산정하였으며, 결과는 mean (%)± standard error of the mean (SEM)으로 나타났다.

$$\text{체중 부하 비율(\%)} = \frac{\text{골관절염 유도 뒷다리 체중 부하량}}{\text{정상 뒷다리 체중 부하량}} \times 100$$

$$\text{상대적 체중 부하 비율(\%)} = \frac{\text{각 군의 체중 부하 비율}}{\text{정상군의 체중 부하 비율}} \times 100$$

6) 혈청 내 간 손상 지표 측정

2주간의 약물 투여 종료 후, 실험동물에서 채취한 혈액을 4 °C에서 1,500 ×g으로 10분간 원심분리로 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 실험에 사용하기 직전까지 -80 °C에서 보관하였다.

이후, 분리된 혈청 내 간 손상 지표인 aspartate transaminase (AST)와 alanine transaminase (ALT) 수치를 측정하였다. AST 수치를 측정하기 위해 e-tube에 25 µL의 기질액을 넣고 5분간 37 °C에서 방치한 후, 혈청 5 µL를 추가하고 1시간 동안 37 °C에서 반응시켰다. 이후 25 µL의 정색 시약을 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 다음, 250 µL의 0.4 N NaOH를 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 최종적으로 150 µL씩 96-well plate에 분주하고 microplate reader를 사용해 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 표준 검량선에 대입하여 AST 수치를 구하였다.

ALT 수치를 측정하기 위해 e-tube에 25 µL의 기질액을 넣고 5분간 37 °C에서 방치한 후, 5 µL의 혈청을 추가하고 30분 동안 37 °C에서 반응시켰다. 그 후 25 µL의 정색 시약을 넣고 20분간 실온에서 반응시킨 다음, 250 µL의 0.4 N NaOH를 넣고 10분간 실온에서 반응시켰다. 10분 후, 150 µL씩 96-well plate에 분주하고 microplate reader를 사용해 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 표준 검량선에 대입하여 ALT 수치를 구하였다.

7) 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

혈청 내 reactive oxygen species (ROS)는 다음과 같은 방법으로 측정되었다²¹⁾. 5 µL의 혈청, 95 µL의 50 mM phosphate buffer, 그리고 25 µL의 1.25 µM DCF-DA를 black 96-well plate에 넣고, microplate reader를 사용하여 ex 480 nm/em 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 정상군 대비(fold of normal)로 계

산하여 ROS 수치를 나타내었다.

8) 혈청 및 관절 조직 내 지질과산화 지표 측정

지질과산화 부산물인 malondialdehyde (MDA)를 혈청 및 관절 조직에서 측정하기 위해 thiobarbituric acid reactive substances 측정법을 이용하였다²²⁾. 먼저 e-tube에 100 μ L 혈청 또는 관절 조직 샘플, 50 μ L의 1% H_3PO_4 및 167 μ L의 0.67% thiobarbituric acid를 넣고 45분 동안 95 $^{\circ}C$ 에서 가열하였다. 그 후 얼음을 사용해 뜨거운 열기를 내려주고, 500 μ L n-butanol을 넣은 후 848 $\times g$ 의 조건으로 10분 동안 원심분리하였다. 이후 상층액 150 μ L를 96-well plate에 분주한 후, microplate reader를 사용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 표준 검량선에 대입하여 혈청 및 관절 조직 내 MDA 수치를 구하였다.

9) 혈청 내 전염증성 사이토카인 측정

혈청 내 전염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 수치를 ELISA kit를 사용하여 측정하였으며, 구체적인 측정 방법은 다음과 같다. 각각의 96-well plate를 세척 용액으로 세척한 다음, 100 μ L의 표준물질 또는 혈청을 분주하고 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 잔여물을 제거하고 세척 용액으로 세척한 후 100 μ L 검출 항체를 넣고 실온에서 2시간 배양하였다. 그다음 세척 용액으로 세척하고 1:20으로 희석한 100 μ L streptavidin-horse-radish peroxidase conjugate를 넣고 실온에서 30분간 배양하였다. 남아있는 용액을 제거한 후 세척 용액으로 세척하고 각 well에 100 μ L 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution을 넣고 적절한 발색이 나타날 때까지 실온에서 배양한 다음 100 μ L stop solution을 넣어주었다. 그리고 microplate reader를 사용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 값을 표준 검량선에 대입하여 수치를 구하였다.

10) 관절 조직 내 단백질 발현량 분석

적출한 관절 조직의 단백질 분석을 위해 1% sodium deoxycholate, 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40와 protease inhibitor를 포함한 radioimmunoprecipitation assay 버퍼를 사용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 얼음 위에서 20분간 방치한

후, 원심 분리(13,572 $\times g$, 4 $^{\circ}C$, 20분)하여 단백질을 함유한 상층액을 분리하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

관절 조직에서 GAPDH, NOX2, p22^{phox}, p47^{phox}, p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-p38, p38, p-NF- κ B p65, NF- κ B p65, p-I κ B- α , I κ B- α , iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13, TIMP-1, TIMP-3의 단백질 발현량을 확인하기 위해 8~12% SDS-polyacrylamide gel을 제작하였다. 10 μ g의 단백질을 전기영동하여 SDS-polyacrylamide gel에서 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후, membrane에 분석하고자 하는 1차 항체(PBS-T로 1:1,000 희석)를 처리하여 4 $^{\circ}C$ 에서 overnight 배양하였다. PBS-T로 8분마다 6회 세척하고, 1차 항체에 적합한 2차 항체(PBS-T로 1:5,000 희석)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후, PBS-T로 8분마다 5회 세척하였다.

ECL solution (GE Healthcare, IL, UK)에 membrane을 노출시킨 후, Vilber Fusion Solo X (Vilber Lourmat)를 사용하여 감광시키고 해당 단백질 발현을 확인하였다. 발현된 band는 Evolution Capt Edge software (Vilber Lourmat) 프로그램을 이용하여 정량하였으며, 정상군의 값을 1로 설정하여 각 군의 단백질 발현 수준을 상대적 비율로 나타내었다.

관절 조직 내 aggrecan (AGC)와 glycosaminoglycans (GAGs) 수치는 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. AGC 수치를 측정하기 위해 96-well plate에 관절 조직 샘플 또는 표준물질 100 μ L를 분주하고 37 $^{\circ}C$ 에서 90분간 배양하였다. 그 후 용액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 검출 용액 A를 넣고 37 $^{\circ}C$ 에서 45분간 배양하였다. 이후 용액을 제거하고 세척 용액으로 세척한 다음, 100 μ L의 검출 용액 B를 추가하고 다시 37 $^{\circ}C$ 에서 45분간 배양하였다. 세척 과정을 거친 후, 90 μ L의 기질액을 추가하고 37 $^{\circ}C$ 에서 적절한 발색이 나타날 때까지 배양하였다. 마지막으로 50 μ L의 stop solution을 넣고, microplate reader를 사용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 값은 표준 검량선에 대입하여 수치를 구하였다.

GAGs 수치를 측정하기 위해 96-well plate를 세척 용액으로 세척한 후, 관절 조직 샘플 또는 표준물질 50 μ L와 biotin-labeled antibody 50 μ L를 넣고 37 $^{\circ}C$ 에서 45

분간 배양하였다. 이후 세척 과정을 거쳐 100 μ L의 streptavidin-biotin complex working solution을 추가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 그 후 세척 용액으로 세척한 다음, 90 μ L의 기질액을 추가하고 37 $^{\circ}$ C에서 적절한 발색이 나타날 때까지 배양하였다. 마지막으로 50 μ L의 stop solution을 넣고, microplate reader를 사용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 값은 표준 검량선에 대입하여 수치를 구하였다.

11) 조직병리 분석

부검 후, 적출한 관절 조직은 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 Safranin O 염색을 위해 10% 포르말린 용액에 고정한 뒤 OBEN (Suwon-si, Korea)에 의뢰하여 분석을 진행하였다. 고정된 조직은 70% 알코올, 95% 알코올, 100% 알코올 순서로 탈수 과정을 거쳐 파라핀 블록화되었으며, 이후 microtome (RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Germany)을 사용하여 4 μ m 두께로 절단하였다. 절단된 샘플은 H&E 및 Safranin O 염색을 실시한 후, PANNORAMIC 250 Flash III 디지털 슬라이드 스캐너 (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary)를 통해 이미지를 촬영하였다. 마지막으로, 촬영된 이미지는 CaseViewer 프로그램(3DHISTECH Ltd.)을 사용하여 관찰하였으며, proteoglycan area (%)는 ImageJ 1.52 software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 통해 정량화하였다.

12) 통계처리

모든 수치는 평균(mean)과 표준오차(SEM)로 나타내었으며, SPSS (version 29.0; IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance test를 수행한 뒤, least-significant differences test를 실시하였다. 각 군간의 평균 차이에 대한 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과>>>>>

1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

DGT의 총 폴리페놀 함량은 20.20 ± 0.09 mg GAE/g으

로, 플라보노이드 함량은 2.43 ± 0.02 mg QE/g으로 측정되었다.

2. DPPH 자유 라디칼 소거능

DGT의 항산화 활성을 평가하기 위한 DPPH 자유 라디칼 소거능 분석에서, 양성 대조 물질 L-(+)-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 1.60 ± 0.14 μ g/mL로 측정되었고, DGT의 IC_{50} 값은 85.18 ± 0.49 μ g/mL로 측정되었다(Fig. 2).

3. ABTS 라디칼 소거능

DGT의 항산화 활성을 평가하기 위한 ABTS 라디칼 소거능 분석에서, 양성 대조 물질 L-(+)-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 3.54 ± 0.06 μ g/mL로 측정되었고, DGT의 IC_{50} 값은 160.51 ± 1.20 μ g/mL로 측정되었다(Fig. 3).

4. 뒷다리 체중 부하의 변화

골관절염이 유도된 rat의 통증 변화를 평가하기 위해 뒷다리에 가해지는 체중 부하를 측정하였다. 정상군의 뒷다리 체중 부하를 100으로 설정했을 때, MIA 투여 후 0 day에 모든 골관절염 유도군에서 정상군 대비 유의하게 감소되었다. 그러나 약물 투여 7 days에 대조군과 비

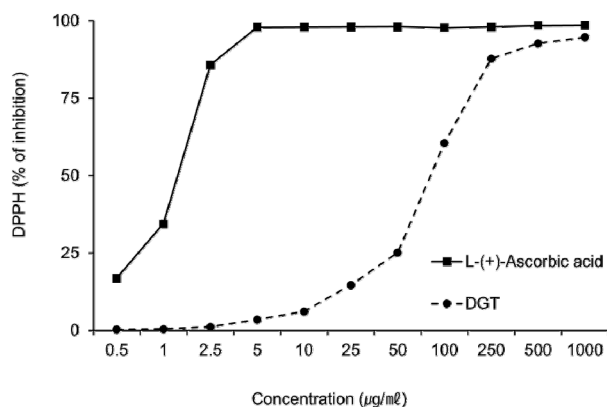


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of DGT. The DPPH free radical scavenging activity was expressed as IC_{50} (μ g/mL). Values are mean of three replicate determinations $\pm$ SEM. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, SEM: standard error of the mean.

교하여 약물 처리군에서 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었으며($p<0.001$), 이 효과는 14 days까지도 지속되었다($p<0.001$). 실험 14 days 후, 뒷다리 체중 부하는 정상군에 비해 대조군 66.1%, INDO군 81.6%, DGTL군 74.5%, DGTH군 81.3%를 지지하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

5. 체중 변화, 식이 섭취량 및 식이 효율 변화

실험 기간 동안의 체중 변화(g) 결과, 정상군 47.5 ± 2.3 이었고, 대조군은 60.4 ± 1.9 으로 1.3배 유의하게 증가하였다($p<0.001$). 대조군 대비 INDO군(53.0 ± 1.9 , $p<0.05$)과

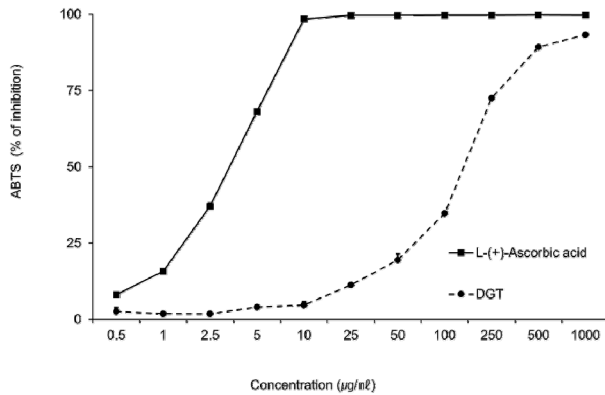


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of DGT. The ABTS radical scavenging activity was expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Values are mean of three replicate determinations $\pm$ SEM. ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, SEM: standard error of the mean.

Table I. Body Weight Change

Group	Initial (g)	Final (g)	Change (g)
Normal	277.5 ± 3.8	325.0 ± 4.4	47.5 ± 2.3
Control	$265.5\pm4.7^*$	325.9 ± 5.9	$60.4\pm1.9^\dagger$
INDO	264.9 ± 3.3	317.9 ± 4.4	$53.0\pm1.9^\ddagger$
DGTL	262.0 ± 4.7	313.1 ± 6.2	$51.1\pm2.3^\S$
DGTH	261.8 ± 3.9	317.3 ± 3.7	55.5 ± 1.5

Body weight change was calculated by subtracting the initial body weight from the final body weight. All values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=10/\text{group}$).

Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, SEM: standard error of the mean.

* $p<0.05$ and $^\dagger p<0.001$ indicate a significant difference from the normal group, while $^\ddagger p<0.05$ and $^\S p<0.01$ indicate a significant difference from the control group.

DGTL군(51.1 ± 2.3 , $p<0.01$)은 유의하게 적었으며, DGTH군(55.5 ± 1.5)은 감소하는 경향을 보였다(Table I).

식이 섭취량은 DGTL군에서 대조군 대비 6.4% 감소하였으며, 다른 약물 처리군에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table II).

마지막으로 체중 변화량, 식이 섭취량을 이용해 식이 효율(%)을 구한 결과, 정상군 $20.6\pm0.9\%$ 였던 반면 대조군은 $26.6\pm0.7\%$ 로 유의하게 높았다($p<0.001$). INDO군

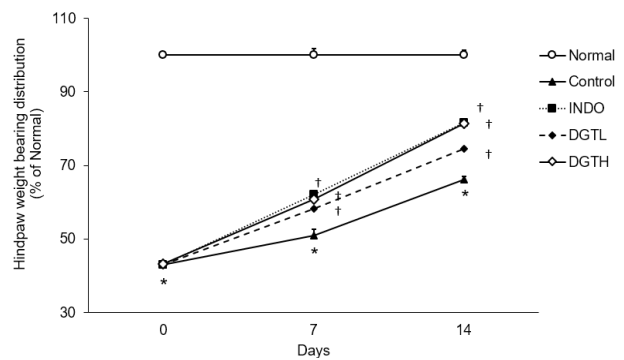


Fig. 4. Effect of DGT on hindpaw weight bearing distribution. Changes in hindpaw weight bearing distribution were monitored at weekly intervals following MIA injection. All values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=10/\text{group}$). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p<0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while $^\dagger p<0.001$ indicates a significant difference from the control group.

($24.0 \pm 0.9\%$, $p < 0.05$)과 DGTL군($24.1 \pm 1.0\%$, $p < 0.05$)은 대조군 대비 각각 9.8%와 9.4% 유의하게 감소하였으나, DGTH군($25.0 \pm 0.7\%$)은 유의미한 차이를 보이지 않았다(Table II).

6. 혈청 내 간 기능 지표 분석

간 기능 지표인 AST의 수치(IU/L)를 분석한 결과, 정상군 15.1 ± 1.2 였으나, 대조군은 20.7 ± 0.5 로 1.4배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 INDO군 18.1 ± 0.7 , DGTL군 18.6 ± 0.7 , DGTH군 18.1 ± 0.4 모두 대조군 대비 유의

하게 감소하였다($p < 0.05$).

ALT의 수치(IU/L)에서는 정상군이 6.4 ± 0.3 인 반면, 대조군은 8.2 ± 0.4 로 1.3배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). INDO군 7.1 ± 0.2 ($p < 0.05$)과 DGTH군 7.1 ± 0.1 ($p < 0.05$)은 대조군 대비 유의하게 감소하였으나 DGTL군 7.6 ± 0.3 은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

7. 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 분석

혈청에서 산화적 스트레스 마커인 ROS를 측정된 결과(fold of normal), 골관절염이 유도된 대조군에서는 정

Table II Body Weight Change, Food Intakes, and Feed Efficiency Ratio

Group	Body weight change (g/14 days)	Food intakes (g/14 days)	Feed efficiency ratio (%)
Normal	47.5 ± 2.3	231.1 ± 1.9	20.6 ± 0.9
Control	$60.4 \pm 1.9^*$	226.9 ± 4.2	$26.6 \pm 0.7^*$
INDO	$53.0 \pm 1.9^\dagger$	221.0 ± 1.5	$24.0 \pm 0.9^\dagger$
DGTL	$51.1 \pm 2.3^\ddagger$	$212.3 \pm 1.6^\S$	$24.1 \pm 1.0^\dagger$
DGTH	55.5 ± 1.5	222.2 ± 2.9	25.0 ± 0.7

Feed efficiency ratio (%) was calculated by dividing the change in body weight by the amount of food intake. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=10/group).

Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, SEM: standard error of the mean.

* $p < 0.001$ indicate a significant difference from the normal group, while $^\dagger p < 0.05$, $^\ddagger p < 0.01$, and $^\S p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

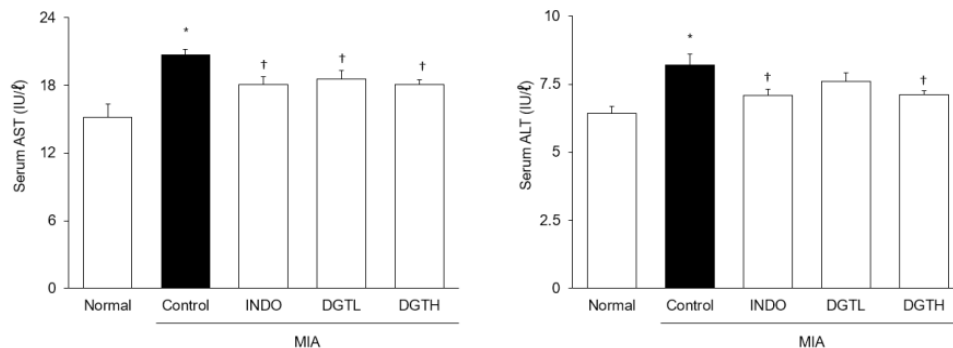


Fig. 5. Effect of DGT on serum AST and ALT in MIA-induced osteoarthritis rats. AST and ALT levels were measured in serum using commercial kits. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=10/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, AST: aspartate transaminase, ALT: alanine transaminase, MIA: monosodium iodoacetate, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while $^\dagger p < 0.05$ indicates a significant difference from the control group.

상군에 비해 ROS 수준이 2배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 이러한 증가는 경구 투여된 약물에 의해 유의하게 감소하였으며, 감소율은 INDO군은 40.8%, DGTL군은 36.7%, DGTH군은 41.3%로 나타났다($p < 0.001$) (Fig. 6).

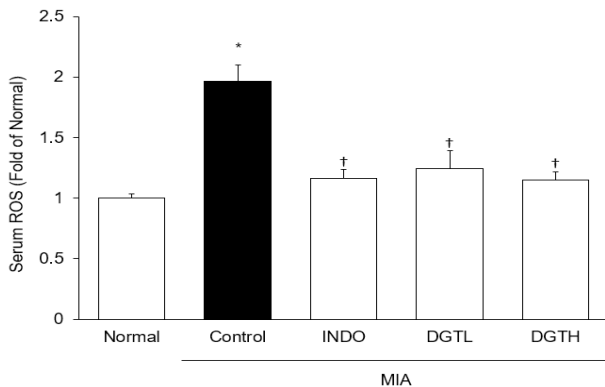


Fig. 6. Effect of DGT on serum ROS in MIA-induced osteoarthritis rats. The oxidative stress marker ROS was measured in serum. All values are expressed as mean±SEM (n=10/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, ROS: reactive oxygen species, MIA: monosodium iodoacetate, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p < 0.001$ indicates a significant difference from the control group.

8. 혈청과 관절 조직 내 지질과산화 지표 분석

혈청 및 관절 조직에서의 지질과산화 지표인 MDA 수준을 측정하였다.

혈청 MDA 수치(nmol/mL)를 분석한 결과, 정상군은 1.4 ± 0.08 이었으나, 대조군은 2.4 ± 0.13 으로 1.7배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 INDO군(1.8 ± 0.09), DGTL군(2.0 ± 0.08), DGTH군(1.9 ± 0.16) 모두 대조군 대비 유의하게 감소하였으며, 특히 DGT 처리군에서는 농도의존적으로 감소하였다.

관절 조직 내 MDA 수치(nmol/mg protein)를 분석한 결과, 정상군은 11.4 ± 0.12 이었으나, 대조군은 20.6 ± 1.01 로 1.8배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 INDO군(14.4 ± 0.94), DGTL군(16.4 ± 1.02), DGTH군(15.7 ± 1.07) 모두 대조군 대비 유의하게 감소하였다. 특히 DGT 처리군에서 농도의존적으로 감소하였고, DGTH군은 DGTL군에 비해 관절 조직 내 MDA를 4.3% 더 감소시켰다 (Fig. 7).

9. 혈청 내 전염증성 사이토카인 분석

혈청에서 염증성 사이토카인을 측정한 결과(pg/mL), MIA에 의해 골관절염이 유도된 대조군에서는 TNF- α 와 IL-6 수준이 정상군에 비해 각각 1.8배, 2.2배 유의하게

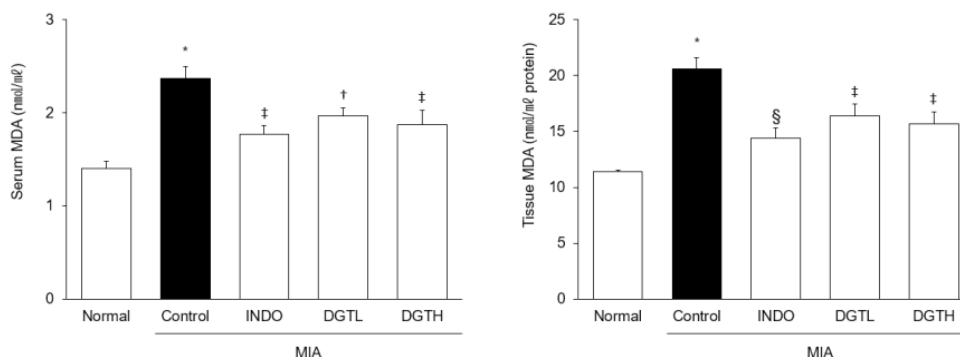


Fig. 7. Effect of DGT on serum MDA and tissue MDA in MIA-induced osteoarthritis rats. The lipid peroxidation marker MDA was measured in both serum and tissue. All values are expressed as mean±SEM (serum, n=10/group; tissue, n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, MDA: malondialdehyde, MIA: monosodium iodoacetate, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, and § $p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

증가하였다($p<0.001$). 이러한 염증 마커들의 증가는 DGT의 경구 투여에 의해 유의하게 감소하였으며, TNF- α 는 DGTL군에서 24.0%, DGTH군에서 31.4% 감소하였다. IL-6는 DGTL군에서 32.4%, DGTH군에서 44.3% 감소하였으며, DGTH군은 DGTL군에 비해 TNF- α 를 9.7%, IL-6를 17.6% 더 감소시켰다(Fig. 8).

10. 관절 조직 내 전염증성 사이토카인 발현 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), TNF- α 의 발현은 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.61 ± 0.10 ($p<0.001$)에서 유의하게 증가하였으나, 약물 투여군에서는 INDO군 1.17 ± 0.04 ($p<0.001$), DGTL군 1.34 ± 0.06 ($p<0.01$), DGTH군 1.32 ± 0.05 ($p<0.01$)으로 유의하게 감소하였다.

또한, IL-1 β 의 발현 역시 정상군 1.00 ± 0.03 대비 대조

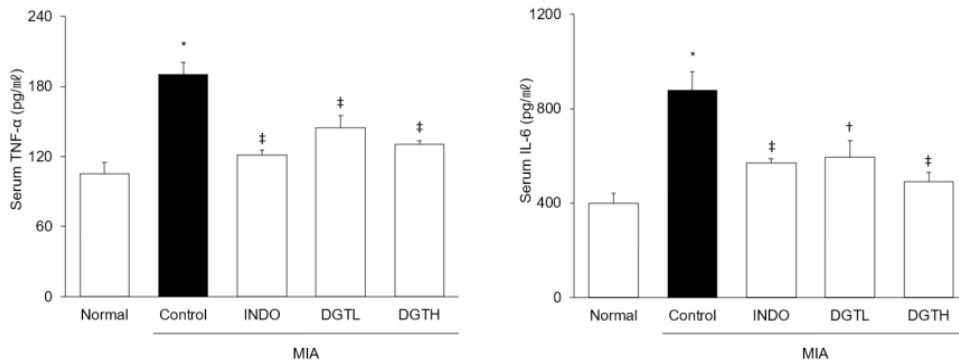


Fig. 8. Effect of DGT on serum TNF- α and IL-6 in MIA-induced osteoarthritis rats. The inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were measured in serum. All values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=10$ /group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, MIA: monosodium iodoacetate, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SEM: standard error of the mean. * $p<0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p<0.01$ and ‡ $p<0.001$ indicate a significant difference from the control group.

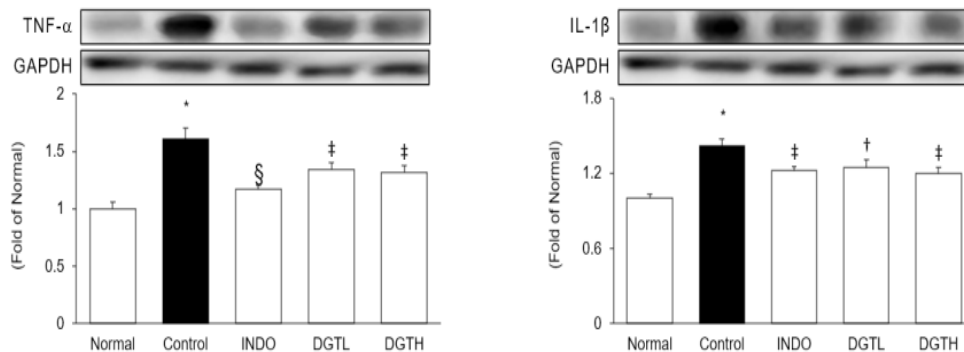


Fig. 9. Effects of DGT on TNF- α and IL-1 β protein expressions. The inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , were analyzed using Western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=7$ /group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p<0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p<0.05$, ‡ $p<0.01$, and § $p<0.001$ indicate a significant difference from the control group.

군 1.42 ± 0.06 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으며, 약물 투여군에서는 INDO군 1.22 ± 0.03 ($p < 0.01$), DGTL군 1.25 ± 0.06 ($p < 0.05$), DGTH군 1.20 ± 0.05 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

11. 관절 조직 내 AGC와 GAGs 분석

관절 조직 내 AGC와 GAGs를 분석하였다. 관절 조직 내 AGC 수치를 분석한 결과(ng/mg protein), 정상군은 53.6 ± 2.3 이었으나, 대조군은 37.4 ± 2.9 로 30.2% 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 INDO군(52.0 ± 4.5), DGTL군(49.5 ± 4.1), DGTH군(55.1 ± 3.7) 모두 대조군 대비 유의하게 증가하였다. 특히 DGT 처리군에서는 농도의존적으로 증가하였으며, DGTH군은 DGTL군보다 관절 조직 내 AGC 수치를 1.1배 더 증가시켰다.

관절 조직 내 GAGs 수치를 분석한 결과(ng/mg protein), 정상군은 33.9 ± 2.0 이었으나, 대조군은 12.7 ± 3.2 로 62.5% 유의하게 감소하였다($p < 0.001$). 그러나 INDO군(27.2 ± 4.9), DGTH군(32.4 ± 2.9)에서는 대조군 대비 유의하게 증가하였다($p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively). 반면, DGTL군은 20.0 ± 3.1 로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 10).

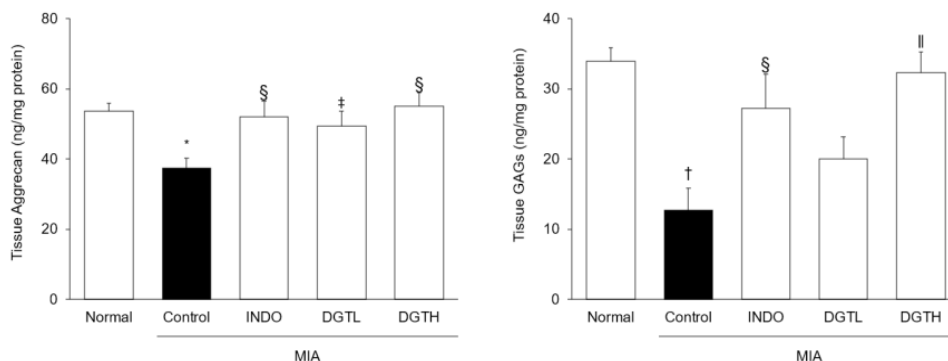


Fig. 10. Effect of DGT on tissue AGC and GAGs in MIA-induced osteoarthritis rats. AGC and GAGs, which are components of the cartilage matrix, were measured in tissue. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, AGC: aggrecan, GAGs: glycosaminoglycans, MIA: monosodium iodoacetate, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.01$ and † $p < 0.001$ indicate a significant difference from the normal group, while ‡ $p < 0.05$, § $p < 0.01$, and ‖ $p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

12. 관절 조직 내 NOX2, p22^{phox} 및 p47^{phox} 분석

관절 조직에서 western blot을 통한 NOX2, p22^{phox} 및 p47^{phox}의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과(fold of normal), 정상군(1.00 ± 0.03) 대비 대조군(1.53 ± 0.05)에서 NOX2 발현이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 INDO군(1.25 ± 0.07 , $p < 0.01$), DGTL군(1.28 ± 0.07 , $p < 0.01$), DGTH군(1.18 ± 0.06 , $p < 0.001$)에서는 대조군 대비 유의하게 감소하였으며, 특히 DGTH군에서 22.9%로 가장 큰 감소 효과를 보여주었다.

또한, p22^{phox}와 p47^{phox}의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), 정상군 대비 대조군은 각각 1.34배, 1.42배 유의하게 증가하였다($p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively). p22^{phox}에서 DGT 처리는 농도의존적으로 단백질 발현을 감소시켰으며, 특히 DGTH군에서 대조군 대비 23.9%로 약물 처리군 중 가장 큰 감소 효과를 나타냈으며($p < 0.01$), p47^{phox}에서는 대조군 대비 18.3%의 감소 효과를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 11).

13. 관절 조직 내 p-PI3K와 p-Akt 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 p-PI3K와 p-Akt의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), p-PI3K의 발현은 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.37 ± 0.04 ($p < 0.001$)

에서 유의하게 증가하였으나, 약물 투여군에서는 INDO군 1.11 ± 0.07 ($p < 0.01$), DGTL군 1.18 ± 0.06 ($p < 0.05$), DGTH군 1.15 ± 0.08 ($p < 0.05$)으로 유의하게 감소하였다.

또한, p-Akt의 발현 역시 정상군 1.00 ± 0.03 대비 대조

군 1.40 ± 0.11 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으며, 약물 투여군에서는 INDO군 1.00 ± 0.07 ($p < 0.001$), DGTL군 1.13 ± 0.05 ($p < 0.01$), DGTH군 1.05 ± 0.04 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였다.

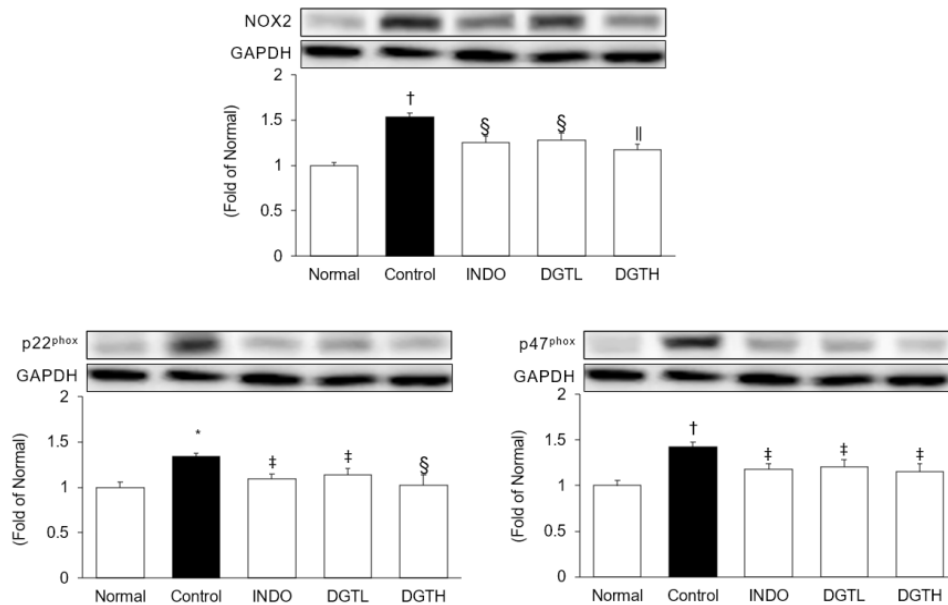


Fig. 11. Effects of DGT on NADPH oxidase (NOX2), p22^{phox}, and p47^{phox} protein expressions. The protein expressions of NOX2, p22^{phox}, and p47^{phox}, subunits of NADPH oxidase responsible for ROS production, were examined using western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, ROS: reactive oxygen species, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.01$ and $^{\dagger}p < 0.001$ indicate a significant difference from the normal group, while $^{\ddagger}p < 0.05$, $^{\S}p < 0.01$, and $^{\parallel}p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

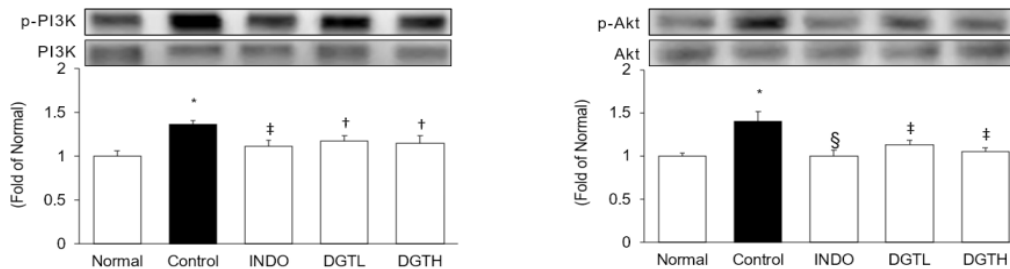


Fig. 12. Effects of DGT on p-PI3K and p-Akt protein expressions. The expression of p-PI3K and p-Akt, which are intracellular signaling factors that regulate cell activation, physiological responses, and inflammation, was evaluated using western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while $^{\dagger}p < 0.05$, $^{\ddagger}p < 0.01$, and $^{\S}p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

결과적으로 p-PI3K와 p-Akt의 단백질 발현은 DGT 처리에 의해 감소하였다(Fig. 12).

14. 관절 조직 내 p-p38, p-NF- κ B p65 및 p-I κ B- α 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 p-p38, p-NF κ B p65 및 p-I κ B- α 의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), p-p38의 발현은 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.54 ± 0.08 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으나, 약물 투여군에서는 INDO군 1.20 ± 0.07 ($p < 0.01$), DGTL군 1.33 ± 0.08 ($p < 0.05$), DGTH군 1.24 ± 0.06 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였다.

또한, p-NF- κ B p65의 발현 역시 정상군 1.00 ± 0.04 대비 대조군 1.55 ± 0.11 ($p < 0.001$)로 1.55배 유의하게 증가하였다. INDO군 1.23 ± 0.05 ($p < 0.01$), DGTH군 1.28 ± 0.07 ($p < 0.01$)으로 유의하게 감소하였으나, DGTL군 1.44 ± 0.04 로 감소하는 경향을 보였다.

마지막으로, p-I κ B- α 의 발현은 정상군 1.00 ± 0.04 대비 대조군 1.43 ± 0.04 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으나, 약물 투여군에서는 INDO군 1.19 ± 0.03 ($p < 0.01$), DGTL군 1.21 ± 0.05 ($p < 0.01$), DGTH군 1.06 ± 0.07 ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하였다.

결과적으로 세 인자의 단백질 발현은 DGT 처리에 의해 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 13).

15. 관절 조직 내 iNOS와 COX-2 발현 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), iNOS의 발현은 정상군 1.00 ± 0.05 대비 대조군 1.41 ± 0.04 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으나, 약물 투여군에서는 INDO군 1.12 ± 0.02 ($p < 0.001$), DGTL군 1.18 ± 0.07 ($p < 0.01$), DGTH군 1.12 ± 0.05 ($p < 0.001$)으로 유의하게 감소하였다.

또한, COX-2의 발현 역시 정상군 1.00 ± 0.06 대비 대조군 1.38 ± 0.10 ($p < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으며,

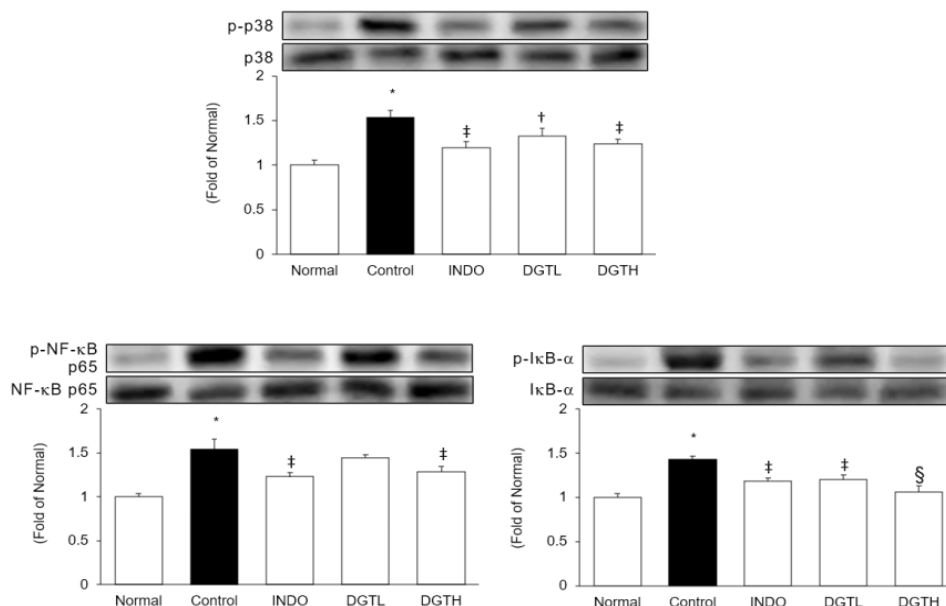


Fig. 13. Effects of DGT on p-p38, p-NF- κ B p65, and p-I κ B- α protein expressions. The p-p38/p-NF- κ B p65/p-I κ B- α pathway is a key signaling axis that regulates inflammation by mediating the phosphorylation and activation of molecules in the NF- κ B signaling pathway, and was thus evaluated using western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, NF- κ B: nuclear factor κ B, I κ B- α : inhibitor of κ B- α , Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, and § $p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

약물 투여군에서는 INDO군 1.06 ± 0.05 , DGTL군 1.07 ± 0.05 , DGTH군 1.07 ± 0.04 로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$) (Fig. 14).

16. 관절 조직 내 콜라겐 관련 인자 발현 분석

1) Collagenases 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 collagenases (MMP-

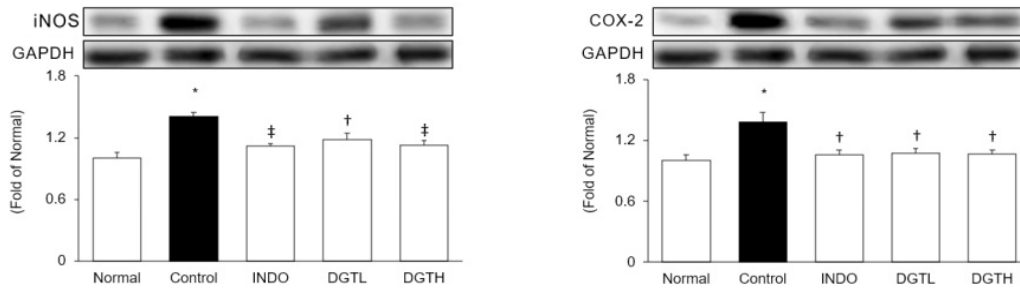


Fig. 14. Effects of DGT on iNOS and COX-2 protein expressions. To assess the downstream effects of NF- κ B p65 signaling, the protein levels of iNOS and COX-2 were measured by western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, iNOS: inducible nitric oxide synthase, COX-2: cyclooxygenase-2, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, while † $p < 0.01$ and ‡ $p < 0.001$ indicate a significant difference from the control group.

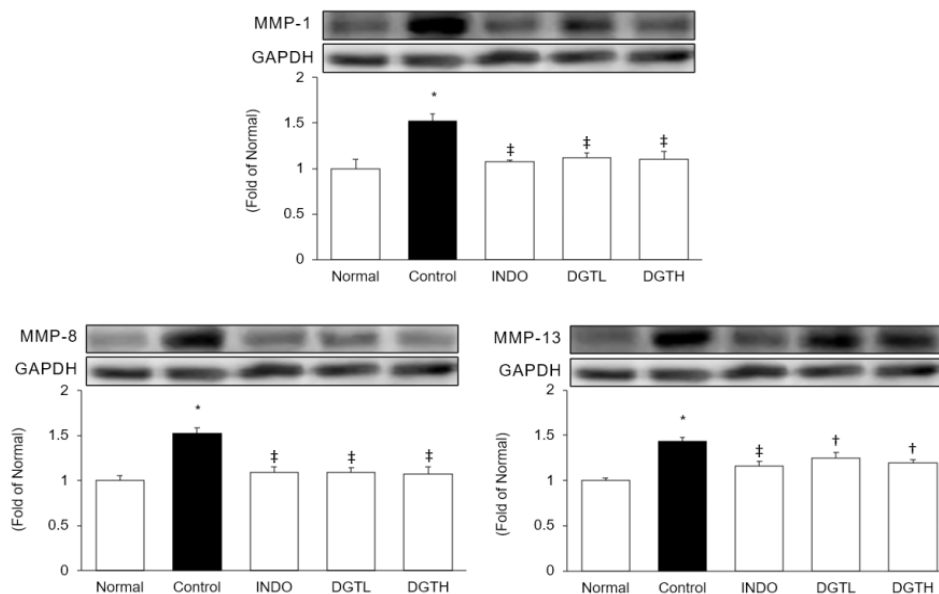


Fig. 15. Effect of DGT on tissue collagenase expression levels. MMP-1, MMP-8, and MMP-13 are mainly classified as collagenases, enzymes that play a key role in breaking down collagen. Protein expression of MMP-1, 8, and 13 was analyzed using western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, MMP: matrix metalloproteinase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates significant difference compared with the normal group, † $p < 0.01$ and ‡ $p < 0.001$ indicate significant difference compared with the control group.

1, MMP-8, MMP-13)의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), MMP-1은 정상군(1.00 ± 0.10) 대비 대조군(1.52 ± 0.08 , $p < 0.001$)에서 1.52배 유의미하게 증가하였으며, 약물 투여군은 대조군에 비해 유의하게 억제되었다($p < 0.001$).

MMP-8의 단백질 발현 역시 정상군(1.00 ± 0.06) 대비 대조군(1.52 ± 0.07 , $p < 0.001$)에서 1.52배 유의하게 증가하였고, MMP-1과 마찬가지로 모든 약물 투여군에서 억제되었다($p < 0.001$).

마지막으로, MMP-13의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군(1.00 ± 0.03) 대비 대조군(1.43 ± 0.04 , $p < 0.001$)에서 1.43배 유의미하게 증가하였고, 약물 투여군은 대조군에 비해 유의하게 억제되었다(INDO, $p < 0.001$; DGTL, $p < 0.01$; DGTH, $p < 0.01$) (Fig. 15).

2) Gelatinases 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 gelatinases (MMP-2)의 단백질 발현을 확인한 결과, 정상군(1.00 ± 0.045) 대비 대조군(1.32 ± 0.054 , $p < 0.01$)에서 MMP-2 발현이 1.32배 유의하게 증가하였으나, INDO군과 DGTH군에서만 대조군 대비 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 대조군 대비 INDO군은 16.7%, DGTH군은 17.4% 유의하게 감소하였다(Fig. 16).

17. 관절 조직 내 TIMPs 발현 분석

관절 조직에서 western blot을 통해 TIMPs (TIMP-1,

TIMP-3)의 단백질 발현을 확인한 결과(fold of normal), TIMP-1은 정상군(1.00 ± 0.06) 대비 대조군(0.85 ± 0.01 , $p < 0.05$)에서 15% 감소하였으며, INDO군에서만 대조군에 비해 1.2배 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

TIMP-3의 단백질 발현도 정상군(1.00 ± 0.03) 대비 대

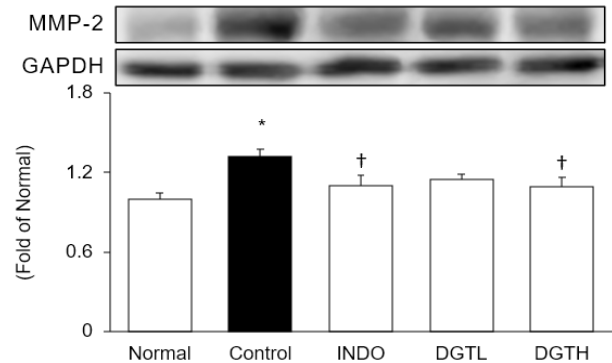


Fig. 16. Effect of DGT on tissue gelatinase expression level. MMP-2, which degrades key components of the basement membrane, is classified under the gelatinase family and was evaluated by western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, MMP: matrix metalloproteinase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.01$ indicates significant difference compared with the normal group, † $p < 0.05$ indicates significant difference compared with the control group.

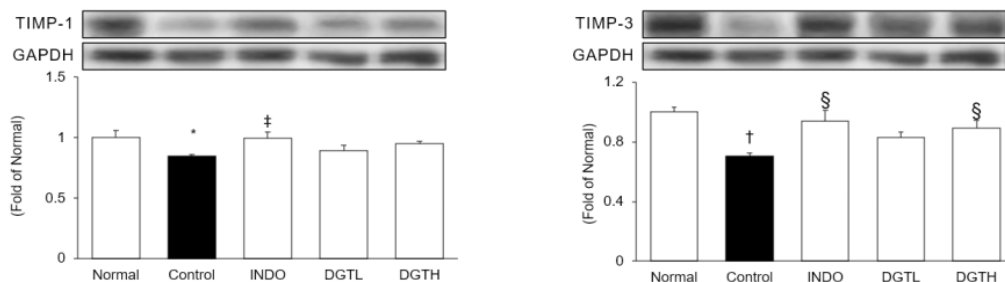


Fig. 17. Effect of DGT on TIMPs expression levels. TIMPs, such as TIMP-1 and TIMP-3, are proteins that regulate the activity of matrix metalloproteinases and were analyzed using western blot. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=7/group). DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, TIMPs: tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin 2 mg/kg body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT 240 mg/kg body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT 479 mg/kg body weight, MIA: monosodium iodoacetate, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.05$ and † $p < 0.001$ indicate significant difference compared with the normal group, ‡ $p < 0.05$ and § $p < 0.01$ indicate significant difference compared with the control group.

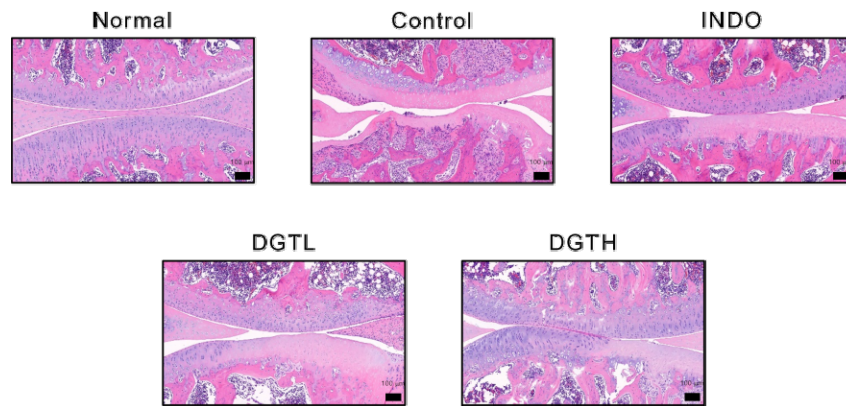


Fig. 18. Histological observation of joints (H&E staining; magnification $\times 100$, scale bar $100\ \mu\text{m}$). H&E staining is primarily used to observe the structural features of tissue in joint specimens. H&E: hematoxylin and eosin, Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin $2\ \text{mg/kg}$ body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT $240\ \text{mg/kg}$ body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT $479\ \text{mg/kg}$ body weight, MIA: monosodium iodoacetate, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*.

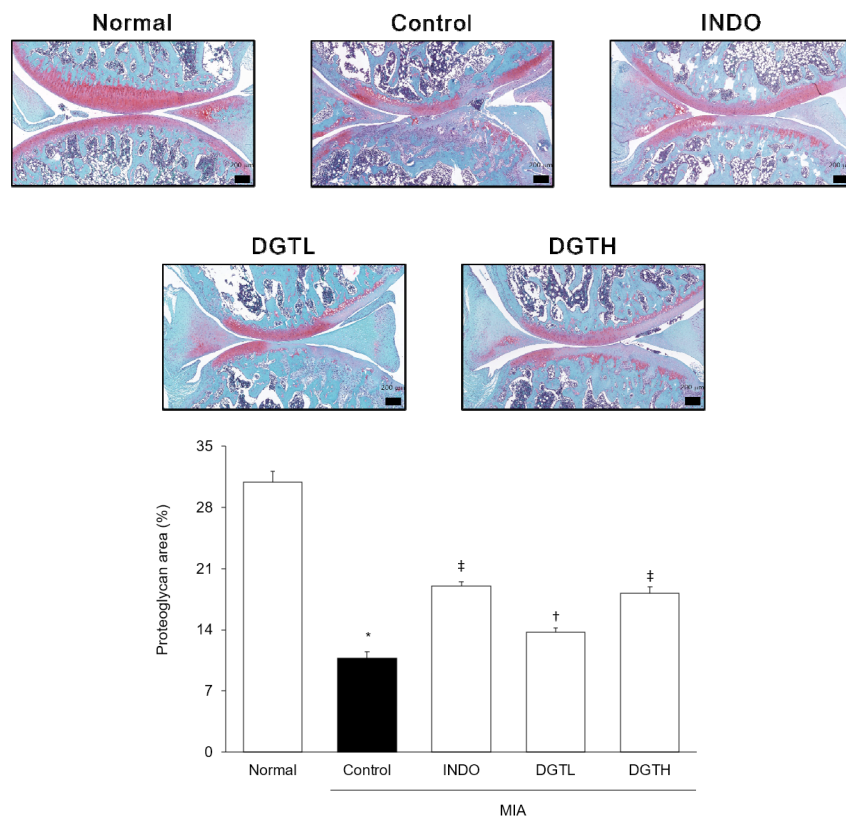


Fig. 19. Histological observation of joints and quantification of proteoglycan-positive area (Safranin O staining; magnification $\times 50$, scale bar $200\ \mu\text{m}$). Safranin O staining is primarily used to assess the condition of cartilage. It strongly binds to glycosaminoglycans, particularly proteoglycans, which are key components of cartilage. All values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=3/group). Normal: normal rats without MIA injection, Control: MIA-induced osteoarthritis, water administered, INDO: MIA-induced osteoarthritis, indomethacin $2\ \text{mg/kg}$ body weight, DGTL: MIA-induced osteoarthritis, DGT $240\ \text{mg/kg}$ body weight, DGTH: MIA-induced osteoarthritis, DGT $479\ \text{mg/kg}$ body weight, MIA: monosodium iodoacetate, DGT: *Dokhwalgisaeng-tang*, SEM: standard error of the mean. * $p < 0.001$ indicates significant difference compared with the normal group, † $p < 0.05$ and ‡ $p < 0.001$ indicate significant difference compared with the control group.

조군(0.70 ± 0.02 , $p < 0.001$)에서 30% 유의하게 감소하였다. 특히, INDO군과 DGTH군에서만 대조군 대비 1.3배 유의하게 증가하였다($p < 0.01$) (Fig. 17).

18. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

연골 손상 보호 상태를 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군은 변형 없이 정상적인 연골 상태를 보였으나, 대조군에서는 골관절염이 유발되어 불규칙하고 탈락된 연골 표면 등 연골 변성이 현저하게 나타났다. INDO군과 DGT를 처리한 군은 대조군에 비해 MIA에 의한 연골 손상이 효과적으로 억제된 것으로 확인되었다(Fig. 18).

관절 조직의 proteoglycan 소실 정도를 평가하기 위해 Safranin O 염색을 실시한 결과, 대조군에서는 proteoglycan의 많은 부분이 파괴되어 연골 형태학적 변화가 발생하였다. 반면, INDO군과 DGT를 처리한 군에서는 대조군에 비해 proteoglycan 소실이 억제된 것으로 관찰되었다. 또한, DGT군보다 DGTH군에서 proteoglycan 파괴 억제 효과가 더욱 두드러지게 나타났다(Fig. 19).

추가적으로, Safranin O 염색을 통한 proteoglycan-positive area 분석 결과, 대조군은 정상군(30.93 ± 1.19) 대비 65.1% 유의하게 감소하였다(10.79 ± 0.66 , $p < 0.001$). 특히 INDO군과 DGTH군에서는 대조군 대비 각각 1.8배 및 1.7배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 19).

고찰»»»»»

DGT는 전통적으로 風濕痺에 해당하는 만성 관절통 증상에 사용되어 온 처방으로, 현대의 실험 및 임상 연구에서도 항염증, 항산화, 연골 보호 효과가 보고된 바 있다²³⁻²⁸. 본 연구에서도 DGT는 MIA로 유도된 골관절염 rat에서 감소한 뒷다리 체중 부하를 회복시켜 통증 및 기능장애에 개선 가능성을 보여주었다. 또한 골관절염 유도 후 증가한 체중과 식이 효율이 일부 조절되었으며, AST와 ALT의 유의한 상승 없이 비교적 양호한 안전성 결과를 나타내어, DGT가 기능적 개선과 안전성 측면을 함께 고려할 수 있는 후보 치료제임을 시사하였다.

골관절염의 진행에는 산화적 스트레스와 염증 반응이 핵심적으로 관여한다^{29,30}. 본 연구에서 MIA 대조군은 혈청 ROS와 MDA가 증가하고 관절 조직 내 NOX2, p22^{phox}, p47^{phox} 발현이 상승하여 산화적 손상이 항진된 상태를 보였으나, DGT 투여군에서는 이들 지표가 유의하게 감소하였다³¹. 이는 DGT가 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 경로를 억제하여 ROS 생성과 지질과산화를 완화함으로써 산화적 손상을 줄였음을 시사한다. 아울러 DGT는 TNF- α 와 IL-6를 유의하게 감소시켰고, PI3K/Akt, p38 mitogen-activated protein kinase γ , NF- κ B 신호전달 경로의 억제를 확인하였다. 이러한 결과는 DGT가 상위 염증 신호를 조절함으로써 하위 염증 매개인의 발현을 억제하고, 결과적으로 관절 내 염증

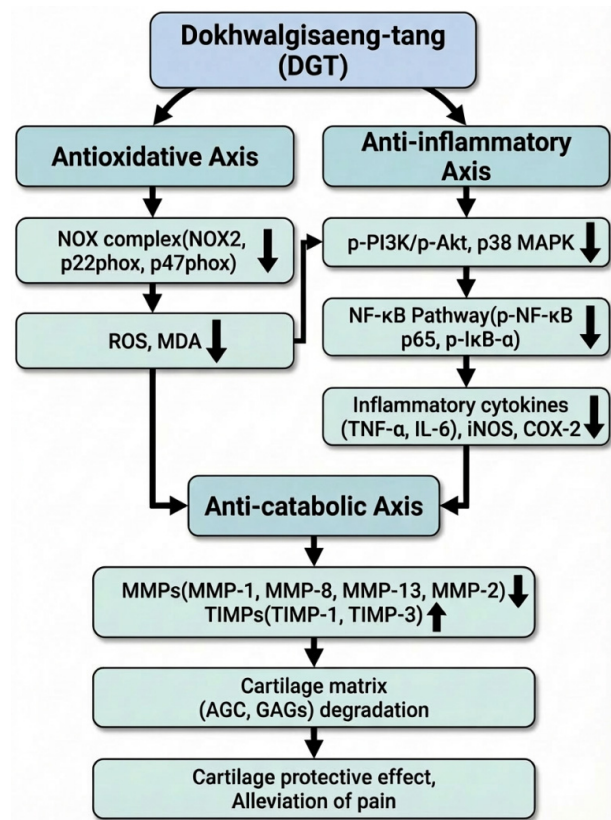


Fig. 20. Integrated therapeutic mechanism of *Dokhwalgisaeng-tang* in MIA-induced osteoarthritis. MIA: monosodium iodoacetate, NOX: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, ROS: reactive oxygen species, MDA: malondialdehyde, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, NF- κ B: nuclear factor- κ B, I κ B- α : inhibitor of κ B- α , TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL: interleukin, iNOS: inducible nitric oxide synthase, COX: cyclooxygenase, MMP: matrix metalloproteinase, TIMPs: tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, AGC: aggrecan, GAGs: glycosaminoglycans.

성 미세환경을 완화하는 데 기여했음을 보여준다^{32,33}).

이와 함께 DGT 투여군에서는 iNOS와 COX-2 발현이 감소하였고, 연골기질 분해에 관여하는 MMP-1, MMP-8, MMP-13 및 MMP-2의 과발현도 억제되었다³⁴⁻³⁶). 반면 TIMP-3는 회복되는 양상을 보여, DGT가 MMP/TIMP 간 불균형을 일부 개선함으로써 연골기질 분해를 억제했을 가능성을 시사하였다^{37,38}). 이러한 분자생물학적 변화와 일치하게 AGC와 GAGs의 보존이 확인되었으며, 조직학적으로도 연골 표면 손상, 연골 두께 감소, 염증세포 침윤, proteoglycan 소실이 완화되었다. 이는 DGT가 단순히 염증을 억제하는 데 그치지 않고 연골기질 보존과 구조적 손상 완화에도 관여할 수 있음을 보여주는 결과이다(Fig. 20).

종합하면, DGT는 MIA 유도 골관절염 모델에서 산화적 스트레스와 염증 반응을 동시에 조절하고, 연골기질 분해를 완화하며, 그 결과 통증 및 기능장애를 개선하는 효과를 나타냈다. 즉, DGT의 효과는 항산화, 항염증, 연골 보호 기전이 복합적으로 작용한 결과로 해석될 수 있다. 다만 본 연구는 단일 동물모델과 제한된 투여 기간 및 용량을 바탕으로 수행되었으며, 통증 평가를 위해 뒷다리 체중 부하만을 측정하여 통증의 다각적인 측면을 평가하기에는 한계가 있다. 또한, 개별 구성 약재나 활성물질의 기여도 및 작용기전은 구분할 수 없었으며, 제시된 분자생물학적 경로는 관찰된 변화에 근거한 것으로 인과관계나 선후관계를 확인하기 위해서는 추가 실험이 필요할 것이다.

따라서 향후 다양한 골관절염 모델에서의 재현성 검증, 활성 성분 분리 연구, 장기 안전성 평가 및 임상 연구가 추가로 이루어진다면 DGT의 골관절염 치료 가능성을 보다 명확히 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

본 연구에서는 DGT가 MIA로 유도된 골관절염 동물 모델에 미치는 영향을 평가하기 위해 뒷다리 체중 부하, 산화적 스트레스 관련 인자, 염증 관련 지표, 연골기질 관련 인자 및 조직병리학적 변화를 관찰하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MIA 투여 후 골관절염 유발군에서 뒷다리 체중 부하가 유의하게 감소하였고, DGT 처치는 7일째부터 유의미한 회복을 보였다.
2. 혈청 ROS와 MDA, 그리고 혈청 TNF- α 및 IL-6는 골관절염 대조군에서 증가하였으나, DGT 투여에 따라 유의하게 감소하였다.
3. 관절 조직 내 AGC와 GAGs는 DGT 처치에 따라 농도 의존적으로 증가하였다.
4. 관절 조직에서 NOX2, p22^{phox}, p47^{phox} 발현은 DGT 투여군에서 억제되었으며, PI3K/Akt 및 NF- κ B 경로의 활성 또한 감소하였다.
5. DGT는 iNOS, COX-2와 함께 MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-2의 발현을 억제하였고, TIMP-3의 회복을 나타냈다.
6. 조직병리학적 분석에서 DGT는 연골 표면 손상 및 proteoglycan 소실을 완화하였다.

이상의 결과를 종합하면, DGT는 MIA로 유도된 골관절염 동물 모델에서 산화적 스트레스와 염증 반응을 억제하고 연골기질 분해를 완화함으로써, 통증 및 기능장애를 개선하고 연골 손상을 보호하는 효과를 나타냈다. 따라서 DGT는 골관절염의 진행을 완화할 수 있는 치료제로서의 가능성을 시사한다.

References»»»»

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 5th ed. Paju:Globooks. 2020: 116-8.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 8th ed. Seoul:Chosin Publishing Co. 2020:430.
3. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. Lancet. 2019;393(10182):1745-59.
4. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology. 2014;10(7):437-41.
5. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. Annals of the Rheumatic Diseases. 2014;

- 73(9):1659-64.
6. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, Kraus VB, Lohmander LS, Abbott JH, Bhandari M, Blanco FJ, Espinosa R, Haugen IK, Lin J, Mandl LA, Moilanen E, Nakamura N, Snyder-Mackler L, Trojian T, Underwood M, McAlindon TE. OARSÍ guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019;27(11):1578-89.
7. Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, Towheed T, Welch V, Wells G, Tugwell P; American College of Rheumatology. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care & Research*. 2012;64(4):465-74.
8. Arden NK, Perry TA, Bannuru RR, Bruyère O, Cooper C, Haugen IK, Hochberg MC, McAlindon TE, Mobasheri A, Reginster JY. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSÍ 2019 guidelines. *Nature Reviews Rheumatology*. 2021;17(1):59-66.
9. Bruyère O, Honvo G, Veronese N, Arden NK, Branco J, Curtis EM, Al-Daghri NM, Herrero-Beaumont G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Rannou F, Rizzoli R, Roth R, Uebelhart D, Cooper C, Reginster JY. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2019;49(3):337-50.
10. D'Arcy Y, Mantyh P, Yaksh T, Donevan S, Hall J, Sadrarhami M, Viktrup L. Treating osteoarthritis pain: mechanisms of action of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, opioids, and nerve growth factor antibodies. *Postgraduate Medicine*. 2021;133(8):879-94.
11. Ghouri A, Conaghan PG. Prospects for therapies in osteoarthritis. *Calcified Tissue International*. 2021;109(3):339-50.
12. Sun SM. Emergency formulas worth a thousand in gold. Seoul:Daeseong Munhwasa. 1992:295.
13. Heo J. Donguibogam. Seoul:Namsandang. 2003:303.
14. Park OJ, Yim JH. A clinical study of lumbago patients on the effect of oriental medicine treatment with Dokhwalgisaeng-tang Gamibang. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2011;28(6):177-84.
15. Ryu SG. A case report on the therapeutic effects of modified Dokhwalgisaeng-tang Gamibang in knee arthralgia. *The Journal of East-West Medicines*. 1980;5(1):49-50.
16. Choi CH, Kim SJ, Shin JC, Wi TS, Kim JH, Choi JB, Kim YE, Na CS. Clinical study of Dokhwalgisaengtanggamibang (DGG) and Gamisayuktanggagambang (GSG) for improving lumbago and knee joint pain. *The Korea Journal of Herbology*. 2013;28(2):75-82.
17. Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1927;73(2):627-50.
18. Malla MY, Sharma M, Saxena RC, Mir MI, Mir AH, Bhat SH. Phytochemical screening and spectroscopic determination of total phenolic and flavonoid contents of *Eclipta alba* Linn. *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 2013;3(2):86-91.
19. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.
20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231-7.
21. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992;13(3):637-48.
22. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978;86(1):271-8.
23. Wu G, Chen W, Fan H, Zheng C, Chu J, Lin R, Ye J, Xu H, Li X, Huang Y, Ye H, Liu X, Wu M. Duhuo Jisheng Decoction promotes chondrocyte proliferation through accelerated G1/S transition in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Medicine*. 2013;32(5):1001-10.
24. Chen JS, Li XH, Li HT, Weng XP, Xu HF, Ye HZ, Liu XX. Effect of water extracts from duhuo jisheng decoction on expression of chondrocyte G1 phase regulator mRNA. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2013;38(22):3949-52.
25. Wu G, Fan H, Huang Y, Zheng C, Ye J, Liu X. Duhuo Jisheng decoction-containing serum promotes proliferation of interleukin-1 β -induced chondrocytes through the p16-cyclin D1/CDK4-Rb pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(5):2525-34.
26. Liu F, Liu G, Liang W, Ye H, Weng X, Lin P, Li H, Chen J, Liu X, Li X. Duhuo Jisheng decoction treatment inhibits the sodium nitroprussiate-induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondrial-dependent signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2014;34(6):1573-80.
27. Chen CW, Sun J, Li YM, Shen PA, Chen YQ. Action mechanisms of du-huo-ji-sheng-tang on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:571479.
28. Lai JN, Chen HJ, Chen CC, Lin JH, Hwang JS, Wang

- JD. Duhuo jisheng tang for treating osteoarthritis of the knee: a prospective clinical observation. *Chinese Medicine*. 2007;2:4.
29. Liu L, Luo P, Yang M, Wang J, Hou W, Xu P. The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: a comprehensive research review. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;9:1001212.
30. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nature Reviews Rheumatology*. 2022;18(5):258-75.
31. Han J, Park D, Park JY, Han S. Inhibition of NADPH oxidases prevents the development of osteoarthritis. *Antioxidants*. 2022;11(12):2346.
32. Tu C, Huang X, Xiao Y, Song M, Ma Y, Yan J, You H, Wu H. Schisandrin A inhibits the IL-1 β -induced inflammation and cartilage degradation via suppression of MAPK and NF- κ B signal pathways in rat chondrocytes. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:41.
33. Batarfi WA, Yunus MHM, Hamid AA, Maarof M, Abdul Rani R. Breaking down osteoarthritis: exploring inflammatory and mechanical signaling pathways. *Life*. 2025;15(8):1238.
34. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50(1):131-41.
35. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis and Rheumatism*. 2009;60(12):3723-33.
36. Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;12(5):409-18.
37. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1803(1):55-71.
38. Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008;4(3):128-35.