

보스웰리아 추출물의 골관절염 억제 효과 연구

남다은¹ · 김옥경¹ · 심태진² · 김지훈² · 이정민^{1,3*}

¹경희대학교 의학영양학과

²(주)진용

³경희대학교 임상영양연구소

Effect of *Boswellia serrata* Extracts on Degenerative Osteoarthritis *in vitro* and *in vivo* Models

Da-Eun Nam¹, Ok Kyung Kim¹, Tae Jin Shim², Ji Hoon Kim², and Jeongmin Lee^{1,3*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²Jinyong Co. Ltd., Gyeonggi 443-734, Korea

³Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT The inhibitory effects of *Boswellia serrata* (BW) extracts on degenerative osteoarthritis were investigated in primary-cultured rat cartilage cells and a monosodium-iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model. To identify the protective effects of BW extract against H₂O₂ (800 μM, 2 hr) *in vitro*, cell survival was measured by MTT assay. Cell survival after H₂O₂ treatment was elevated by BW extract at a concentration of 20 μg/mL. In addition, BW extract treatment significantly reduced and normalized the productions of pro-inflammatory factors, nuclear transcription factor κB, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor-α, and interleukin-6 at a concentration of 20 μg/mL. Treatment of chondrocytes with BW extract significantly reduced 5-lipoxygenase activity and production of prostaglandin E₂, especially at a concentration of 10~20 μg/mL. For the *in vivo* animal study, osteoarthritis was induced by intra-articular injection of MIA into knee joints of rats. Consumption of a diet containing BW extract (100 and 200 mg/kg) for 35 days significantly inhibited the development and severity of osteoarthritis in rats. To determine the genetic expression of arthritic factors in articular cartilage, real-time PCR was applied to measure matrix metalloproteinases (MMP-3, MMP-9, and MMP-13), collagen type I, collagen type II, and aggrecan, and BW extract had protective effects at a concentration of 200 mg/kg. In conclusion, BW extract was able to inhibit articular cartilage degeneration by preventing extracellular matrix degradation and chondrocyte injury. One can consider that BW extract may be a potential therapeutic treatment for degenerative osteoarthritis.

Key words: *Boswellia serrata*, osteoarthritis, primary culture, chondrocytes, monosodium iodoacetate

서 론

퇴행성관절염(osteoarthritis)은 관절을 보호하고 있는 연골의 점진적인 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나서 염증과 통증을 수반하는 만성 퇴행성 질환이다. 2012년 국민건강영양조사 통계에 따르면 우리나라의 골관절염 유병률은 만 50세 이상 인구 가운데 전체 37.3%를 차지하며, 연령의 증가에 따라 특히 여성에서 더 높은 유병률을 나타내고 있다(1). 퇴행성관절염 또는 골관절염은 관절에 일어난 염증으로 흔히 통증, 강직 및 부종이 동반되고 그 원인은 퇴행성 변화, 면역계 이상, 감염, 외상, 대사 장애 등과 더불어 일상생활의 활동장애 및

운동장애를 유발하여 삶의 질을 저하시키는 대표적인 퇴행성 질환이다(2). 골관절염의 발병과 관련된 인자들을 크게 분류해 보면 단백질 가수분해효소(proteolytic enzymes), cytokines, 그리고 nitric oxide(NO)가 주요 인자들로 알려져 있다(3-6). Nuclear transcription factor κB(NF-κB)는 면역과 염증 반응에 관여하는 여러 유전자들의 transcription factor로, TNF-α와 IL-6 등의 염증 관련 cytokine과 염증 효소인 5-lipoxygenase(5-LO), cyclooxygenase-2(COX-2) 및 matrix metalloproteinases(MMPs)의 전사를 조절하는 인자로 알려져 있으며, 연골조직에서의 이러한 물질 대사 과정은 연골조직의 퇴화에 중추적인 역할을 하고 있다(7-9). 또한 관절염 발병 시 MMP-3, MMP-9 그리고 MMP-13 등의 발현이 증가하며, 이러한 MMPs 증가로 인해 연골을 구성하는 collagen matrix를 손상시켜 퇴행성관절염을 악화시키는 것으로 알려져 있다(8,10). 이렇듯 퇴행성관절염은 만성적인 질환으로 근본적인 치료 방법이 없기 때문에

Received 31 March 2014; Accepted 2 April 2014

*Corresponding author.

E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

통증의 완화 및 연골손상 방지를 주된 치료 목적으로 하며, 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 진통제, 코르티코스테로이드, 관절강내 하이알루론산 주사 등이 관절염 약물 치료제로 사용되고 있다. 그러나 기존 치료약물의 복용에 따른 부작용 및 장기복용 부담 등이 문제점으로 나타나면서 최근 들어 관절염에 대한 건강기능식품의 기호도 및 수요가 급격히 증가하고 있으며, 또한 이를 반영하듯 2010년 국내의 개별인정형 건강기능식품 총생산액의 13%인 150억원 정도가 관절과 뼈 건강에 관한 기능성 제품으로 높은 비율을 차지하는 것으로 나타났다(11). 관절 및 뼈 건강 관련 건강기능성 식품 가운데 대다수의 경우 glucosamine과 chondroitin이 시장성을 형성하고 있지만(12,13) 일부 의학계에서 기능성식품으로서의 glucosamine 효과에 대한 의문점을 제기한 바 있고 향후 지속적인 관절염 건강기능식품의 시장을 유지, 형성하고 골관절염 관련 기능성 소재의 개발을 위해서는 이를 대체할 방안이 필요하며, 이러한 시점에서 새로운 골관절염 기능성의 건강기능식품 원료 필요성이 증대되고 있다.

보스웰리아는 인도전통 아유르베다 의학서에 만성염증 및 관절염, 소염, 타박상, 호흡기 질환 및 설사 등에 사용하였다고 기록되어 있으며, 높은 소염 진통 효과로 진통 및 염증 치료에 지속적으로 사용되어 온 것으로 알려져 있다. 보스웰리아의 주요 성분은 보스웰릭산(boswellic acid)과 테르페노이드 형태의 향산화물질들로, 이중 보스웰릭산은 보스웰리아의 소염 및 진통 효과를 나타내는 기능 물질이다(14). 보스웰릭산은 5-lipoxygenase(5-LO)의 활성을 저해시킴으로 신체내 염증반응 물질 및 염증 유발물질인 TNF- α , IL-6 등의 cytokine 생성을 억제하고, 연골 조직을 구성하는 단백질의 생성 촉진과 연골세포의 cell death를 저해시키는 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(7,15,16).

이러한 근거에 따라 보스웰리아 추출물은 퇴행성 골관절 질환에 유의한 효과가 있을 것으로 사료되나 아직 이에 대한 기전적, 효능적 실험 연구는 미미한 실정이다. 이에 보스웰리아 추출물이 관절 질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고 향후 기능성식품 소재의 개발을 위한 가능성을 확인하고자, 세포 수준에서 보스웰리아 추출물의 기전검증과 약물로 관절염을 유발한 rat에서 보스웰리아 추출물 섭취 효능을 관찰하여 검증하였다.

재료 및 방법

실험재료

보스웰리아 추출물(*Boswellia serrata* extract: Wokvel TM, manufactured by Pharmanza India)은 (주)진용(수원, 한국)으로부터 분말 형태로 공급받아 실험에 사용하였다. 세포 실험을 위한 실험재료의 준비는 분말 형태의 보스웰리아 추출물을 0.2% 에탄올(Merk, Darmstadt, Germany)에 녹여 사용하였으며, 동물실험에 사용된 보스웰리

아 식이는 주문 시에 분말 형태로 그대로 첨가하여 사용하도록 하였다.

연골세포의 분리 및 배양

연골 채취를 위한 실험동물은 4~6주령 무게 약 180~200 g 정도의 male Sprague-Dawley rat을 경추탈골 하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 관절연골을 2~3 mm 정도 크기로 채취하였고 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮겼다. 0.1% EDTA-CDMF(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 30분씩 2회 incubation 시키고(37°C, 5% CO₂), 0.25% trypsin으로 1시간 incubation(37°C, 5% CO₂) 하였다. 2 mg/mL collagenase type I(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 shaker에 120 rpm으로 12시간 동안 처리하였다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 100 μ m pore size cell strainer (BD Falcon, Franklin lakes, NJ, USA)에 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(Hyclone Laboratories)으로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포는 10% FBS(Hyclone Laboratories)와 DMEM(Hyclone Laboratories)에 1% penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories)과 1% L-glutamine(Hyclone Laboratories) 그리고 0.1% gentamycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 75T flask에 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 이때 2~3일에 한 번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대하였으며 세포의 passage는 5 이하로 사용하였다.

Cell viability 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 보스웰리아 추출물을 농도별로 처리하여 24시간(독성시험) 또는 2시간(H₂O₂ 처리 후 세포재생시험) 동안 배양하였다. 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 20 μ L 처리하여 최대 3시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 200 μ L를 가하여 560 nm에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준오차를 구하였다.

Prostaglandin E₂ 측정

염증성 매개물질인 prostaglandin E₂(PGE₂)의 발현 확인을 위해 실험동물에서 분리한 연골세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 보스웰리아 추출물을 농도별로 처리하고 lipopolysaccharide(Sigma-

Aldrich Co.) 50 µg/mL 처리하여 24시간 배양 후에 상층액을 따서 PGE₂를 측정하였다. 측정을 위해 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)의 Prostaglandin E₂ Assay kit을 이용하여 R&D Systems의 protocol을 따라서 실험을 하였으며, ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

5-Lipoxygenases(5-LO)의 측정

보스웰리아 추출물의 5-LO 저해 활성을 측정하기 위해 실험동물에서 분리한 연골세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 보스웰리아 추출물을 농도별로 처리하고 lipopolysaccharide(Sigma-Aldrich Co.) 50 µg/mL 처리하여 24시간 배양 후에 상층액을 따서 5-LO를 측정하였다. 측정을 위해 Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)의 Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay kit을 이용하여 Cayman Chemical의 protocol을 따라서 실험을 하였으며, ELISA reader(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

연골세포에서 Real-time polymerase chain reaction에 의한 유전자 발현 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 6-well plate에 5×10⁶ cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 보스웰리아 추출물을 LPS 또는 H₂O₂와 함께 연골세포에 2시간 동안 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Germantown, MD, USA)로 제조사

의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis kit(BIO-RAD, Singapore, Singapore)을 이용하여 5 µg의 total RNA에 5× iScript select reaction mix를 4 µL, Oligo(dT) Primer set 2 µL(Table 1), RNA sample 5 µL, Nuclease-Free Water 8 µL를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1 µL를 넣어 pipette으로 up & down 하여 골고루 섞어주었다. 42°C에서 60분, 85°C에서 5분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 PCR 반응에 사용하였다. Real-time PCR 실험 시 사용한 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)이며 iQ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)의 protocol에 따라 수행하였다. PCR을 위한 혼합액 최종 농도는 cDNA 2 µL(10~100 ng), 2X iQ SYBR Green supermix 10 µL, forward & reverse primer 각 1 µL(250 nM), H₂O 7 µL가 되도록 하였다. 95°C에서 10분간 hot start 한 후 95°C에서 15초간, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초간 40 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다.

실험동물 및 군 분류

실험동물은 6주령의 male Sprague-Dawley(SD) rat(대 한바이오텍, 충북, 한국)을 군당 8마리씩 총 48마리를 cage에 각각 넣고 일주일 동안 순화시킨 뒤 사용하였다. 사육실의 온도는 25±2°C, 습도 55±10%로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였고 물과 고형사료는 자유롭게 공급하였다. 실험군 분류는 Table 2에 제시하였다.

Table 1. Primer set sequence used for real-time PCR

Sequence name	Forward sequence	Reverse sequence	NCBI reference
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1
Aggrecan	GAA GTG GCG TCC AAA CCA A	CGT TCC ATT CAC CCC TCT CA	NM_022190.1
Collagen type I	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA	CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA	BC133728
Collagen type II	GCA ACA GCA GGT TCA CGT ACA	TCG GTA CTC GAT GAT GGT CTT G	L48440
MMP-3	GAG TGT GGA TTC TGC CAT TGA G	TTA TGT CAG CCT CTC CTT CAG AGA	NM_133523.2
MMP-9	GCG CCA GCC GAC TTA TGT	AAT CCT CTG CCA GCT GTG TGT	NM_031055.1
MMP-13	ACG TTC AAG GAA TCC AGT CTC TCT	GGA TAG GGC TGG GTC ACA CTT	NM_133530.1
COX-2	AGA GAA AGA AAT GGC TGC AGA GTT	AGC AGG GCG GGA TAC AGT	S67722.1
NF-κB	GCA CCA AGA CCG AAG CAA TT	GAA ACC CCA CAT CCT CTT CCT T	NM_001276711.1
TNF-α	ACA AGG CTG CCC CGA CTA T	CTC CTG GTA TGA AGT GGC AAA TC	X66539.1
IL-6	GCC CTT CAG GAA CAG CTA TGA	TGT CAA CAA CAT CAG TCC CAA GA	M26744.1

Table 2. Experimental design animals (n=8/group)

Groups	Induced arthritis	Dietary administration	Orally administration
Normal	-	AIN 93G diet	
Sham	+	AIN 93G diet	
CLX	+	AIN 93G diet	Celecoxib 10 mg/kg
BW50	+	AIN 93G diet + Boswellia 50 mg/kg	
BW100	+	AIN 93G diet + Boswellia 100 mg/kg	
BW200	+	AIN 93G diet + Boswellia 200 mg/kg	

식이 및 급여

보스웰리아 추출물 제공에 따른 관절염 예방 및 연골보호 효과를 관찰하기 위해 관절염 유발 2주일 전부터 보스웰리아가 첨가된 식이를 제공하고, 유발 후 3주간 지속적으로 보스웰리아 식이를 제공하며 관찰하였다. 보스웰리아 추출물은 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg 농도로 AIN93G diet에 첨가하여 시료를 제조하였으며 양성대조군으로는 항관절염 효과가 있는 약물인 Celecoxib(Pfizer, New York, NY, USA)를 사용하였다(17,18). Celecoxib(CLX) 투여군은 존대를 이용하여 주 5회 일정시간에 10 mg/kg으로 경구 투여 하였으며, 식이는 3일에 한 번씩 교환하고 이때 잔여무게(일부 cage 안으로 떨어진 것을 회수)를 측정하여 섭취량을 환산하였다. 물에 대한 접근은 임의대로 하였으며 음용한 양은 3일에 한 번씩 측정하고 새로운 물로 교환하였다.

관절염 모델

6주령의 male SD rat을 이용하며 Zoletile(cat. No. 06516, Virbac, Carros, France)과 Rumpun(cat. No. 41882, 바이엘코리아, Seoul, Korea)을 2:1 비율로 희석한 후에 복강주사로 마취시켰다. 마취시킨 rat의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA(Sigma-Aldrich Co.)를 1 mL 주사기로 양쪽 무릎 관절강 내에 50 μ L(60 mg/mL)씩 주사하였다. MIA 희석 시에는 saline 용액을 사용하고 약물 주사 7일 후에 관절 부위 부종 정도와 실험동물의 걷는 상태를 관찰하여 관절염 유발 확인 후 실험을 진행하였다.

관절염 유발 동물 연골에서 Real-time polymerase chain reaction에 의한 유전자 발현 측정

관절염 유발 실험동물 희생 후, 동물에서 분리한 연골세포를 6-well plate에 5×10^6 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 세포를 수거하여 RNA 추출 및 cDNA 합성과정을 거쳐 유전자 발현을 측정하였다. 95°C에서 10분간 hot start 한 후 95°C에서 15초, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초간 40 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 얻어진 결과는 SPSS 20.0 software(IBM, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군간 평균 차이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

MTT에 의한 보스웰리아 추출물의 적정농도의 결정

Primary culture된 연골세포에 대한 보스웰리아 추출물의 적정농도를 결정하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 보스웰리아 추출물 20 μ g/mL 이상 농도에서 유의적으로 세포생존률이 감소하여 독성이 나타난 것으로 확인되었다(data not shown). 골관절염 실험에 대한 *in vitro* 모델은 LPS 또는 H_2O_2 로 염증을 유발하는 것이 일반적으로 알려져 있다(19,20). 골관절염의 경우 연골세포의 사멸 억제와 세포 재생에 초점이 맞추어져 있으며, 단순 염증유발의 경우 LPS로 충분하지만 세포사멸을 유도하기 위해서는 H_2O_2 처리 후 실험을 진행하는 것이 적절할 것으로 판단되어(21), H_2O_2 800 μ M에서 2시간 처리 후 세포생존률을 확인하였다. 그 결과 시험대조군에서 50~68% 정도의 사멸을 나타내는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 이러한 실험 결과를 바탕으로 보스웰리아 추출물과 H_2O_2 처리하였으며, H_2O_2 만을 처리한 대조군(60.8%)에 비해 20 μ g/mL 농도를 처리한 세포에서 73.1% 수준까지 세포생존률이 증가하여 연골세포 사멸 억제 효과가 나타났음을 확인하였다. 또한 5 μ g/mL와 10 μ g/mL 농도에서 역시 대조군에 비해 각각 71.8%와 68.1%로 세포생존률이 증가하여 대조군에 비해 유의적으로 연골세포 재생 효과가 나타난 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 5~20 μ g/mL 농도에서 세포사멸 억제가 가장 효과적으로 나타나는 것을 확인하였으며, 이에 따라 적정농도를 5, 10, 20 μ g/mL로 설정하여 실험을 진행하였다.

보스웰리아 추출물의 NF- κ B, TNF- α 및 IL-6 생성 억제 활성화

NF- κ B는 면역과 염증 반응 관련 여러 인자의 transcription factor로, 염증 관련 cytokine과 염증 효소 등의 전사를 조절하는 인자로 알려져 있다. 대부분의 염증반응은 COX-2, IL-6, TNF- α 등의 염증유발 사이토카인이 관련된

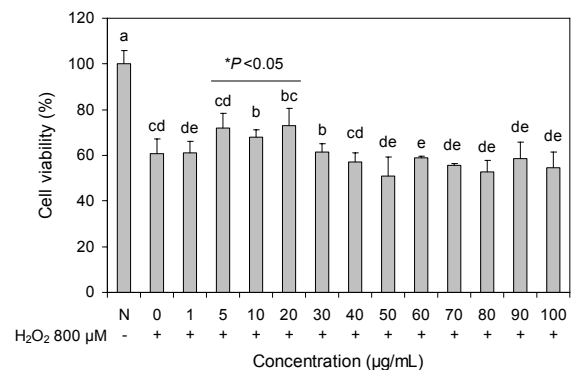


Fig. 1. Cell viability of primary cultured rat cartilage cells, determined by MTT reagent, with treatment of BW extract at various concentrations. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

것으로 알려져 있으며, 실험적인 측면에서 염증유발은 대개 LPS를 통해 이루어지는데 그 활성화 경로의 중심에는 NF-κB가 자리 잡고 있다. 우선 LPS 수용체를 통해 전달된 활성화 신호는 inhibitor κB(I-κB) kinase(IKK)를 통해 I-κB를 인산화시킴으로 NF-κB를 활성화시키는 것으로 인식되고 있다(22,23). 또한 활성화된 NF-κB는 핵으로 이전하여 TNF-α를 생성시키는데 이렇게 생성된 TNF-α는 다시 NF-κB를 재활성화 시키는데 이용되어 COX-2를 유전적으로 합성하여 염증반응을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 TNF-α의 적절한 생성 조절은 염증반응을 조절하는 중요한 인자가 되고 있다. 또한 골관절염의 경우 관절강 내에서 대식세포 등에 의한 일련의 염증반응으로 TNF-α와 COX-2 등이 과다 생성되는 것으로도 알려져 있다. 본 실험에서는 primary culture를 통해 얻은 rat의 연골세포에 LPS 50 μg/mL 처리하여 염증을 유발하고, 앞선 실험 결과에 따라 결정된 보스웰리아 추출물의 적정농도를 처리한 세포에서 NF-κB 억제 활성을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상 세포에 비해 LPS를 처리한 세포에서 NF-κB가 1.94배 높게 발현되어 염증 유발에 의한 NF-κB 활성이 증가하였음을 확인하였다. 또한 보스웰리아 추출물을 처리한 세포에서 유의적으로 NF-κB 활성이 억제되었으며, 처리한 모든 농도에서 정상군과 비슷한 수준으로 활성이 억제된 것을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 실험 결과에 따라 보스웰리아 추출물이 NF-κB에 의해 조절되는 또 다른 염증인자에 영향을 미칠 것으로 예상되어 추가 실험을 진행하였다.

사이토카인은 세포에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받으며 반감기가 매우 짧아 그 작용하는 범위도 사이토카인이 분비되는 인접한 세포들로 국한되는 특징을 가지고 있다. 관절염에 있어서 IL-1, IL-6, TNF-α는 연골 세포조직의 이화작용에 영향을 주는 사이토카인으로 알려져 있다(24). IL-1은 연골세포조직의 이화작용에서 금속단백분해효소의 발현을 유도하고 serum TGF-β가 연골세포를 증식시키도록 하는 것을 방해한다(25). 퇴행성관절염에

서는 연골세포가 IL-1 수용체를 2배 이상 발현하고 연골생성에 관련된 유전 인자의 합성을 저해한다. TNF-α는 연골세포에서 IL-1과 비슷한 역할을 하며, 골관절염이 진행되면서 TNF-α 수용체가 연골세포와 관절강 조직세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다(26). 또한 이러한 TNF-α는 연골세포, 파골세포 등을 자극하여 IL-6 같은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진, 골관절염에서 연골파괴의 주요 인자로 알려져 있다. 본 실험에서 연골세포에 LPS를 50 μg/mL 처리하여 염증을 유발하고, 앞선 실험 결과에 따라 결정된 보스웰리아 추출물의 적정농도를 처리한 세포에서 TNF-α 및 IL-6 생성 억제 활성을 유전자 발현 측정법을 통하여 확인하였다. TNF-α의 경우, 아무것도 처리하지 않은 정상세포에 비해 LPS를 처리한 세포에서 TNF-α 생성이 2배 증가한 것으로 나타났으며, 특히 10 μg/mL 농도와 20 μg/mL 농도의 보스웰리아 추출물을 처리한 세포에서 유의적으로 TNF-α 생성이 낮아진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). IL-6의 생성을 유전자 발현으로 측정한 결과 역시 보스웰리아 추출물을 처리한 세포에서 유의적으로 IL-6 생성이 억제되는 것으로 나타났으며, 특히 20 μg/mL 농도에서 가장 효과적으로 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

보스웰리아 추출물의 5-lipoxygenase 억제 활성

아라키돈산(arachidonic acid) 대사는 생체 내 염증반응

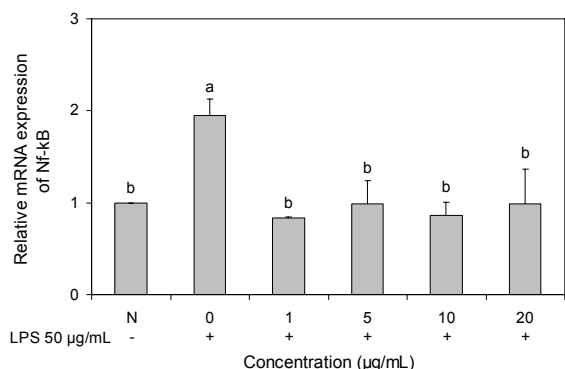


Fig. 2. Effect of BW extract on genetic expression of NF-κB in primary cultured cells. Data are expressed as mean±SD (n=3). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at P<0.05.

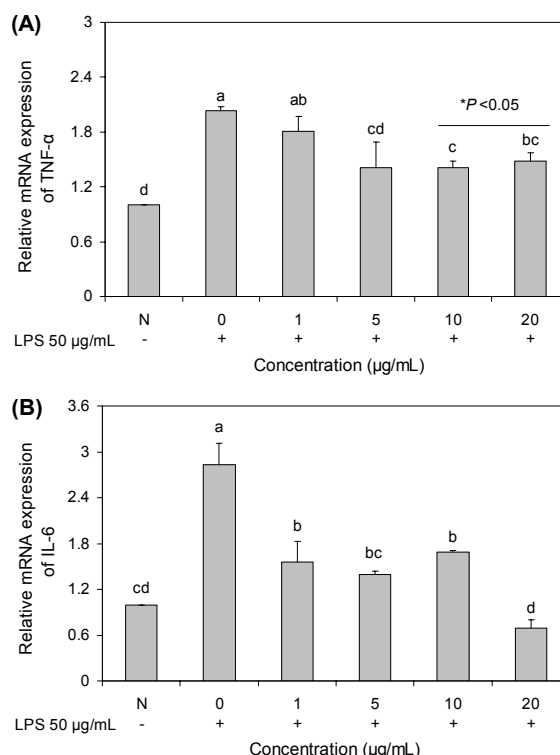


Fig. 3. Effect of BW extract on genetic expression of cytokines in primary cultured cells. A: TNF-α, B: IL-6. Data are expressed as mean±SD (n=3). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at P<0.05.

을 비롯한 항상성을 조절하는 주요 기전의 하나이다. 아라키돈산은 체내 염증생성 화학 전달물질인 프로스타글란딘(prostaglandins)과 염증생성 및 알레르기 반응의 화학적 전달물질인 류코트리엔(leukotrienes) 등의 조절물질 합성에 사용된다(27). 5-LO 효소는 류코트리엔 생합성 경로에 관여하는 핵심 효소로, 5-LO에 의해 생성된 류코트리엔은 면역조절, 천식, 염증 및 여러 알레르기성 증상에 관여하는 매개물질이다(28). 따라서 류코트리엔 생합성 경로의 핵심인 5-LO 효소의 활성 측정을 통해 보스웰리아 추출물의 효능을 검증하고자 하였다. Primary culture를 통해 얻은 rat의 연골세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하고, 앞선 실험 결과에 따라 결정된 보스웰리아 추출물의 적정농도를 처리한 세포에서 5-LO 활성을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상세포(0.14 μmol)에 비해 LPS를 처리한 세포에서 5-LO 활성이 1.01 μmol 로 증가하여 염증이 유발되었음을 확인하였고, 보스웰리아 추출물을 함께 처리한 세포에서 5-LO 활성이 유의적으로 감소한 것으로 나타나 보스웰리아 추출물의 5-LO 억제 활성을 확인하였다. 특히 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 5-LO 활성이 0.21 μmol 로 감소하여 염증반응 억제 효능이 나타난 것을 확인하였다(Fig. 4).

보스웰리아 추출물의 COX-2, PGE₂ 생성 억제 활성

PGE₂ 생성을 촉진하여 염증을 유발시키는 COX 효소는 COX-1과 COX-2의 두 가지 형태가 존재한다. COX-1은 지속적으로 일정량 생성되어 여러 종류의 prostaglandin의 합성에 관여하여 혈장의 항상성, 위액분비, 혈소판응고 등에 관여하는 반면, COX-2의 경우는 TNF- α 와 LPS 등의 외부인자에 의해 일시적으로 유도·생성되어 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다(29,30). COX-2 발현을 측정한 결과, 정상 세포에 비해 LPS를 처리한 세포에서 COX-2 발현이 6배 증가했으며, 보스웰리아 추출물 5-20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 2배 이상 COX-2의 발현이 감소된 것으로 확인되었다(Fig. 5A).

PGE₂는 염증반응에서 COX-2의 발현이 증가함에 따라

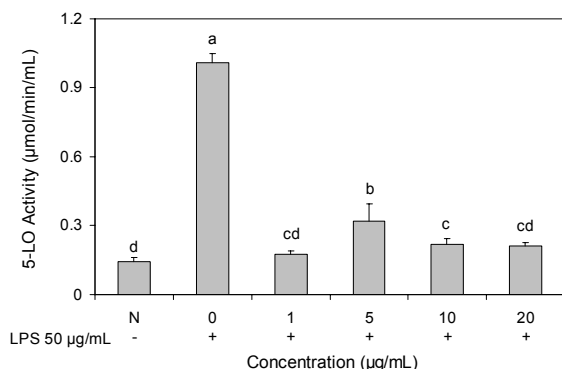


Fig. 4. Inhibitory effect of BW extract on 5-lipoxygenase activity in primary cultured cells. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

IL-1, TNF- α 등에 의해 영향을 받아 생산되고 골관절염 발병 시 관절연골 degradation에 관여하는 인자이다(31,32). 또한 COX-2 발현에 따라 생성된 PGE₂는 골극(osteophytes)을 형성하여 비정상적인 골 성장 및 통증을 나타내며 이러한 증상은 퇴행성관절염에서 흔히 발생하는 것으로 잘 알려져 있다(33). 본 실험에서는 primary culture를 통해 얻은 rat의 연골세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하고, 보스웰리아 추출물의 적정농도를 처리한 세포에서 PGE₂ 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 정상세포(49.4 $\mu\text{g/mL}$)보다 LPS를 처리한 세포에서 154.67 $\mu\text{g/mL}$ 로 PGE₂ 생산이 68% 증가한 것으로 나타났으며, 반면 보스웰리아 추출물을 처리한 세포에서는 PGE₂ 생산이 45% 이상 감소한 것으로 나타났다. 특히 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 가장 효과적으로 PGE₂ 생산이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 5B). 이러한 실험 결과는 앞서 살펴본 NF- κB 와 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 cytokines 및 COX-2 억제를 통한 염증발현을 제어하는 것을 의미하기도 한다. 이상의 실험 결과에 따라서 보스웰리아 섭취 시 관절염 증상을 완화시키고 연골 보호와 예방 효능을 지니는 기능성 소재로써 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있으며, 저농도에서 보스웰리아 추출물의 효과적인 작용이 기능성 소재로의 활용 및 실용에 더욱 유리하게 작용할 것으로 생각된다.

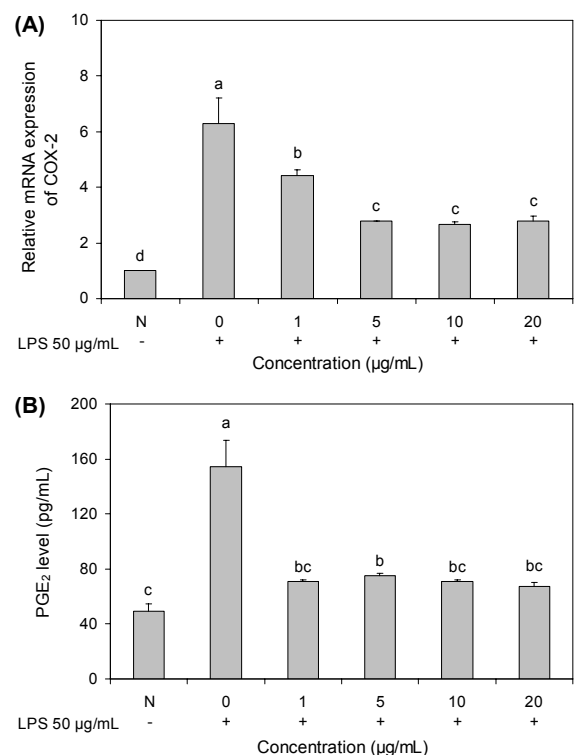


Fig. 5. Inhibitory effect of BW extract on genetic expression in primary cultured cells. A: COX-2, B: PGE₂. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Table 3. Weight gain and food efficiency ratio (FER)

Groups	Induced arthritis	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g) ¹⁾	FER ²⁾
Normal	-	188.60±4.44 ^a	381.23±1.89 ^a	195.02±4.61 ^a	0.0913±0.0005 ^a
Sham	+	186.65±6.31 ^a	361.63±15.97 ^a	174.94±19.95 ^a	0.0925±0.0093 ^a
CLX	+	188.53±4.18 ^a	358.88±15.05 ^a	170.24±15.72 ^a	0.0907±0.1004 ^a
BW50	+	187.18±4.48 ^a	359.45±9.15 ^a	171.56±12.94 ^a	0.0909±0.0004 ^a
BW100	+	180.33±6.64 ^a	354.0±7.37 ^a	171.5±23.87 ^a	0.0897±0.0013 ^a
BW200	+	183.70±11.01 ^a	355.23±13.94 ^a	171.82±19.48 ^a	0.0889±0.0036 ^a

¹⁾Weight gain (g)=final body weight (g)- initial body weight (g).

²⁾FER (food efficiency rate)=gain of body weight (g)/ food intake calories (kcal/day).

Data are expressed as mean±SD (n=8/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at P<0.05.

실험 기간 중 mouse 체중의 변화 및 식이섭취 효율

총 실험기간 5주 동안 매주 2회 식이섭취량과 체중을 측정하였으며, 실험 기간 동안 급여한 물과 식이는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 하루 한 마리의 섭취량을 계산하여 칼로리로 변환 후 식이섭취 효율로 나타내었다. 5주 동안 rat의 몸무게 변화에서는 모든 실험군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 식이섭취 효율의 경우 BW200 군에서 효율이 감소한 것으로 나타났으나 그룹 간 유의적인 차이는 없었으며, 이러한 결과로 미루어 볼 때 보스웰리아 추출물의 섭취가 몸무게 증가 및 증상에 영향을 미치지 않았다는 것을 확인하였다(Table 3).

골관절염 유발 동물모델에서 보스웰리아 추출물 섭취의 효능 평가

연골세포 조직의 생리학적·물리학적 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 인식된다. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, 금속단백분해효소 조직 억제(tissue inhibitors of metalloprotenases, TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되는 반면 이화작용에는 금속단백분해효소(metalloproteinase; MMP), nitric oxide(NO), TNF-α, collagenase, aggrecanase 등이 해당된다.

본 실험에서 동화작용 인자로서 확인한 collagen type I 은 연골세포뿐만 아니라 일반적으로 인체세포에서 가장 많이 분포하고 있으며, collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 연골에 분포하고 있는 collagen 종류 중 약 85~90%를 차지하고 있는 주요 단백질이다. 따라서 collagen type I 과 II의 형성은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자이다. 골관절염 유발 동물에서 채취한 연골조직에서 collagen type I , collagen type II 및 aggrecan 유전자 발현을 측정하여 보스웰리아 추출물의 섭취 효능을 평가하였다. 그 결과 보스웰리아 추출물 200 mg/kg 섭취군인 BW200군에서 골관절염 유발 대조군인 sham군에 비해 유의적으로 유전자 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. Collagen type I 의 경우 보스웰리아 추출물 섭취군이 sham 군과 통계적 유의성이 나타나지는 않았으나, 양성대조군인 CLX 약물 투여군과 비슷한 수준으로 collagen type I 발현

이 증가된 것으로 나타났다. Collagen type II 유전자 발현 역시 CLX 약물 투여군과 비슷하게 발현되었으며, 보스웰리아 추출물 섭취에 따라 농도 유의적으로 효과가 나타났다(Fig. 6A, 6B). 이러한 결과는 비록 collagen type I 에서 통계적 유의성이 나타나지 않았다 하더라도 연골조직에서는 collagen type II가 대부분을 차지하고 있다는 점을 감안할 때 보스웰리아 추출물의 섭취에 따른 골관절염에서의 관절연골 보호 효과가 나타난 것으로 생각된다. Aggrecan은 연골조직에서 대표적으로 합성되는 proteoglycan core protein의 하나로서 aggregation, hyaluronan binding, cell adhesion과 chondrocyte apoptosis에 관여하는 구상단백질인 G1, G2 그리고 G3로 구성되어 있으며 주로 관절에서 외부의 압력(compressive load)으로부터 저항성을 나타내어 관절을 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다(34,35). 실험 결과 sham군을 제외한 모든 실험군에서 유의적으로 aggrecan 발현이 증가하였고, 특히 BW200군에서 CLX 약물 투여군보다 높은 aggrecan 발현이 나타난 것으로 확인되었다(Fig. 6C).

본 실험에서 이화작용 인자로서 확인한 MMPs의 경우, 연골조직이 파괴되면 일반적으로 활성화되어 발현이 증가한다. MMPs는 골 및 연골의 기질 구성요소를 파괴하는 단백질분해효소로서 정상조직의 분화, 창상 치유, 기관 형성, 생식, 혈관생성, 조직흡수 및 재형성 등의 과정에 주요한 역할을 하며 관절염 등의 병적인 상태에서도 발현되어 병인에 주요한 역할을 한다(36,37). MMP-3(Stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소로 관절강 내 MMP-3의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있으며, MMP-13의 경우 collagen type II의 분해효소로 관절연골의 콜라겐 생성 및 재생에 중요한 인자로 알려져 있다(38). MMP-9 역시 퇴행성골관절염에서 발현이 증가하는 주요한 인자로 알려져 있으며, 따라서 MMP-3, MMP-9 및 MMP-13을 이화작용인자에 대한 바이오마커로 선정하여 실험을 진행하였다. 본 실험에서의 MMPs 발현 확인 결과, MMP-3의 경우 관절염이 유발된 sham군에서 MMP-3의 발현이 6.5배 증가하여 골관절염의 유발이 제대로 된 것으로 확인되었고 CLX 및 보스웰리아 섭취군에서 유의적으로 MMP-3의 발현이 감소한 것으로 나타났다.

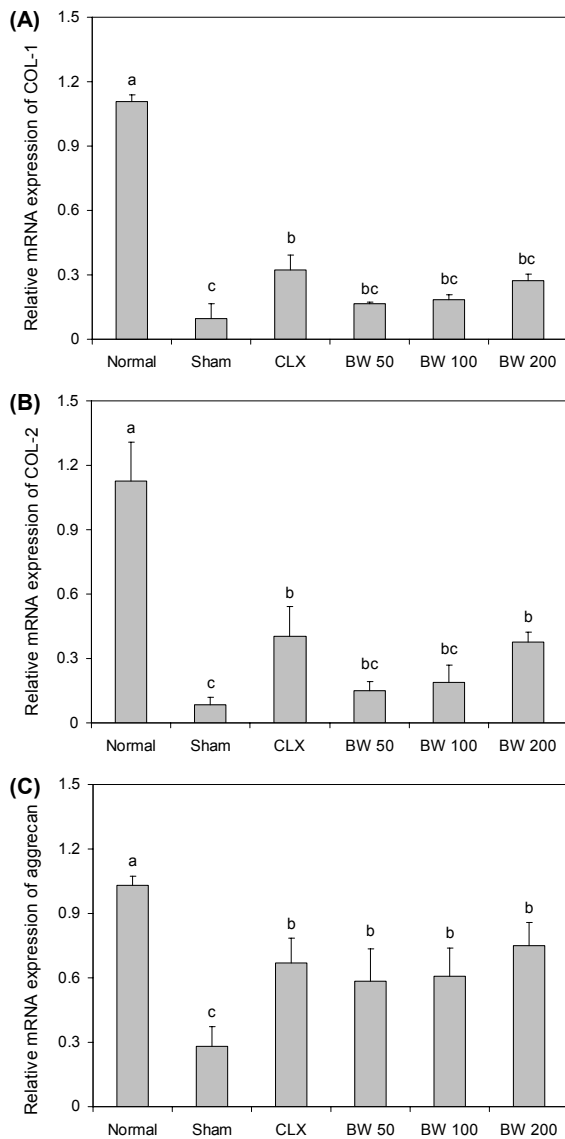


Fig. 6. Genetic expression of anabolic factors in MIA rat articular cartilage. A: COL-1, B: COL-2, C: aggrecan. Data are expressed as mean±SD (n=8/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

특히 BW200군에서 약물 투여 양성대조군인 CLX군과 비슷한 수치로 감소한 것이 확인되었다(Fig. 7A). MMP-9와 MMP-13에서 역시 보스웰리아 섭취군에서 모두 유의적으로 발현이 감소되었으며(Fig. 7B, 7C), 이상의 실험 결과에 따라 보스웰리아 추출물 섭취에 따른 골관절염에서의 관절 연골 보호 효과가 나타난 것으로 생각된다. 따라서 보스웰리아 섭취 시 관절염 증상을 완화시키고 연골 보호 및 예방 효능을 지니는 기능성 소재로서 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다.

요 약

본 실험에서는 primary culture된 연골세포 *in vitro* 실험모

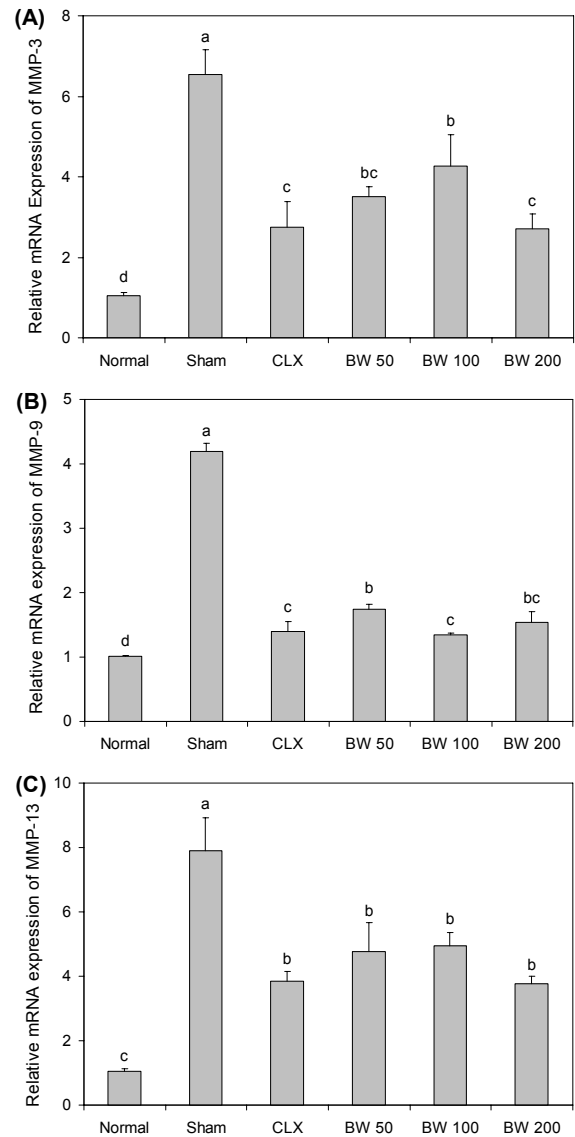


Fig. 7. Genetic expression of catabolic factors in MIA rat articular cartilage. A: MMP-3, B: MMP-9, C: MMP-13. Data are expressed as mean±SD (n=8/group). Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

델과 MIA로 유발한 골관절염 *in vivo* 실험모델을 이용하여 보스웰리아 추출물의 골관절염 예방 효과를 확인하였다. 먼저 MTT 시험법을 통해 세포 사용 적정농도를 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 결정하여 연골세포 사멸 억제를 확인하고, 이를 근간으로 골관절염 동물실험 모델에서 골관절염 예방 효과를 확인하였다. H_2O_2 처리에 따른 산화적 독성으로 연골세포 사멸을 유도한 실험에서 보스웰리아 추출물은 유의적으로 세포사멸을 억제하였으며 이러한 효과는 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이 농도에서 비교적 높게 나타났다. 세포실험에서는 골관절염 발병에 따라 관절연골에 영향을 미치는 염증인자에 대한 기전연구를 진행하였으며, 연골세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 보스웰리아 추출물의 효과를 확인한 실험 결과 면역과 염증반응을 조절하는 nuclear transcription factor

κB(NFκB), 염증관련 cytokine IL-6, TNF-α의 발현이 모두 보스웰리아 추출물 처리 시 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 특히 20 μg/mL 농도에서 가장 효과가 뚜렷하고 일관되게 확인되었다. 또한 이들 cytokine에 의해 생성되는 COX-2 발현과 COX-2에 자극 받아 생성이 촉진되는 PGE₂ 생성을 확인한 결과 역시 20 μg/mL 농도에서 가장 효과적으로 생성이 억제되어 염증을 조절하는 것으로 나타났다. 특히 보스웰리아의 기능성분으로 알려진 보스웰릭산(boswellic acids)에 의해 억제되는 5-LO의 경우, 염증반응 유발의 핵심인자를 생성하는 효소로 알려져 있으며 이를 직접적으로 저해하는 것으로 알려진 보스웰리아의 효능을 확인하고자 실험을 진행하였다. 실험 결과 염증을 유도한 연골세포에서 보스웰리아 추출물의 처리에 따라 5-LO 활성이 감소하였으며, 이는 곧 보스웰리아 추출물이 염증을 유발 핵심 효소인 5-LO 활성을 효과적으로 억제함으로써 연골세포 보호 효과를 나타낸 것이다. 세포실험에서의 기전 결과를 바탕으로 골관절염을 유발한 동물모델에서의 보스웰리아 추출물의 섭취에 따른 효과가 나타날 것으로 기대되어 관절염 유발 동물모델에서 보스웰리아 추출물의 효능검증 실험을 진행하였으며, 세포실험 결과 및 기존의 연구내용을 참고하여 동물에서 보스웰리아의 섭취 농도를 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg으로 결정하고 AIN-93G diet에 보스웰리아 추출물 분말을 섞어 보스웰리아 diet를 제작하여 실험기간 동안 제공하였다. 골관절염 유발 동물모델을 만들기 위해 SD rat의 관절강에 MIA를 injection 하였으며, 보스웰리아 추출물 섭취에 따른 관절염 예방 효과를 관찰하기 위해 관절염 유발 2주일 전부터 제작된 식이를 제공하고 유발 후 3주간 지속적으로 식이 제공 및 관찰하였다. 연골의 주요 구성 성분인 collagen 및 aggrecan은 골관절염 발병 시 여러 인자에 의해 분해되는 것으로 알려져 있으며, 골관절염 유발 동물모델에서 collagen type I, collagen type II 및 aggrecan 유전자 발현을 실시간 정량 PCR로 측정하여 변화를 살펴보았다. 그 결과 골관절염 유발 sham군에 비해 보스웰리아 추출물 섭취군에서 유의적으로 collagen type I, collagen type II 및 aggrecan 발현이 증가하였으며, 특히 BW200군에서 CLX 약물대조군과 비슷한 수준으로 발현이 증가하여 관절연골의 보호 효과가 가장 좋은 것으로 확인되었다. 교원질 합성을 억제하고 분해를 촉진시키는 MMPs (MMP-3, MMP-9, MMP-13)의 발현을 실시간 정량 PCR로 측정하여 발현 변화를 살펴보았다. 그 결과 앞선 다른 실험 결과와 마찬가지로 보스웰리아 섭취군에서 MMPs 유전자 발현이 유의적으로 낮아졌음을 살펴볼 수 있었다. 특히 BW200군에서 MMPs 발현이 유의적으로 감소하였으며, 관절염에 효과적으로 사용되는 약물인 CLX 투여 양성대조군과 비슷한 수치를 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 보스웰리아 추출물은 골관절염에서 관절연골의 보호 효과가 있으며, 이는 골관절염 발생 시 나타나는 염증발현의 기전적인 측면뿐만 아니라 골관절염 유발 동물에서 섭취 효능까지 모

두 일관되게 나타나 골관절염에서의 기능성 소재로서 개발 가능성이 충분할 것으로 생각된다. 또한 후후 실험을 통해 골관절염이 유발된 동물에서 보스웰리아 추출물 섭취 시 관절연골의 형태학적인 변화 및 골상태의 분석과 더불어 관절염 유발 동물의 관절연골 및 혈액학적 분석을 진행하여 동물에서 기전적 측면을 보완하고 보스웰리아 추출물 효능에 대한 추가적인 검증을 하고자 한다.

REFERENCES

1. MOHW. 2012. *Korea Health Statistics 2012: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V-3)*. Ministry of Health and Welfare, Sejong, Korea. p 67, 678.
2. Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. 2011. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J Knee Surg* 24: 251-264.
3. Wu W, Xu X, Dai Y, Xia L. 2010. Therapeutic effect of the saponin fraction from *Clematis chinensis* Osbeck roots on osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate through protecting articular cartilage. *Phytother Res* 24: 538-546.
4. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. 2007. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 8: 493-500.
5. Herrington C, Hall PA. 2008. Molecular and cellular themes in inflammation and immunology. *J Pathol* 214: 123-125.
6. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Samà D, Calatroni A. 2009. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem* 106: 83-92.
7. Ammon HRT. 2010. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine* 17: 862-867.
8. Roy S, Khanna S, Krishnaraju AV, Subbaraju GV, Yasmin T, Bagchi D, Sen CK. 2006. Regulation of vascular responses to inflammation: inducible matrix metalloproteinase-3 expression in human microvascular endothelial cells is sensitive to antiinflammatory *Boswellia*. *Antioxid Redox Sign* 8: 653-660.
9. Park B, Prasad S, Yadav V, Sung B, Aggarwal BB. 2011. Boswellic acid suppresses growth and metastasis of human pancreatic tumors in an orthotopic nude mouse model through modulation of multiple targets. *PLoS One* 6: e26943.
10. Sengupta K, Kolla JN, Krishnaraju AV, Yalamanchili N, Rao CV, Golakoti T, Raychaudhuri S, Raychaudhuri SP. 2011. Cellular and molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of Aflapin: a novel *Boswellia serrata* extract. *Mol Cell Biochem* 354: 189-197.
11. KHIDI. 2011. Health functional food industry development assistance report. Korea Health Industry Development Institute, Chungbuk, Korea. p 8.
12. Lee JW, Do JH. 2005. Market trend of health functional food and the prospect of ginseng market. *J Ginseng Res* 29: 206-214.
13. Kim HK. 2004. Current status and prospect of nutraceuticals. *Food Industry and Nutrition* 9(1): 1-14.
14. Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HP, Safayhi H. 1996. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br J Pharmacol* 117: 615-618.
15. Siddiqui MZ. 2011. *Boswellia serrata*, a potential anti-inflammatory agent: an overview. *Indian J Pharm Sci* 73:

- 255-261.
16. Ammon HP. 2006. Boswellic acids in chronic inflammatory diseases. *Planta Med* 72: 1100-1116.
 17. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Hazek RM, Nada AS. 2009. The effects of celecoxib, a COX-2 selective inhibitor, on acute inflammation induced in irradiated rats. *Inflammopharmacology* 17: 255-266.
 18. El-Ghazaly MA, Nada AS, El-Hazek RM, Khayyal MT. 2010. Effect of selective COX-2 inhibitor, celecoxib on adjuvant-induced arthritis model in irradiated rats. *Int J Radiat Biol* 86: 1079-1087.
 19. Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY, Henrotin Y. 2003. Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Res* 52: 111-118.
 20. Asada S, Fukuda K, Oh M, Hamanishi C, Tanaka S. 1999. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm Res* 48: 399-403.
 21. Khan IM, Gilbert SJ, Caterson B, Sandell LJ, Archer CW. 2008. Oxidative stress induces expression of osteoarthritis markers procollagen IIA and 3B3(-) in adult bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 698-707.
 22. Gilmore TD. 1999. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844.
 23. Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R. 2003. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 15: 299-306.
 24. Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. 2012. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidence-based review. *Drugs Aging* 29: 343-358.
 25. Baugé C, Girard N, Leclercq S, Galéra P, Boumédiène K. 2012. Regulatory mechanism of transforming growth factor beta receptor type II degradation by interleukin-1 in primary chondrocytes. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1823: 983-986.
 26. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 33-42.
 27. Ghosh J, Myers CE. 1997. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 418-423.
 28. Sailer ER, Schweizer S, Boden SE, Ammon HP, Safayhi H. 1998. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* 256: 364-368.
 29. Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 2000. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750-11757.
 30. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. 1997. Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 237: 28-32.
 31. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120.
 32. Bensen WG, Fiechtner JJ, McMillen JI, Zhao WW, Yu SS, Woods EM, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Geis GS. 1999. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 74: 1095-1105.
 33. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS. 2002. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 46: 1789-1803.
 34. Lee V, Cao L, Zhang Y, Kiani C, Adams ME, Yang BB. 2000. The roles of matrix molecules in mediating chondrocyte aggregation, attachment, and spreading. *J Cell Biochem* 79: 322-333.
 35. Abaskharoun M, Bellemare M, Lau E, Margolis RU. 2010. Expression of hyaluronan and the hyaluronan-binding proteoglycans neurocan, aggrecan, and versican by neural stem cells and neural cells derived from embryonic stem cells. *Brain Res* 1327: 6-15.
 36. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ. 2003. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum* 48: 1292-1301.
 37. Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ. 2005. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum* 52: 2386-2395.
 38. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1997. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 40: 1653-1661.