

CIA 생쥐의 關節炎 유발에 대한 淸熱瀉濕湯加味方의 억제 효과

조종철 · 박종오 · 이용구¹ · 신현규² · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 대전대학교 부속한방병원, 2: 한국한의학연구원

Inhibitory Effect of Ceongryulsaseuptang-kami on Arthritis occurrence in Collagen Induced Arthritis Mouse

Jong cheol Cho, Jong oh Park, Yong koo Lee¹, Hyun kyu Shin², Dong hee Kim*

Department of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
1: Daejeon University Oriental hospital, 2: Korea Institute of Oriental Medicine.

To evaluate effect of CRSST on inhibiting the occurrence of arthritis, we performed the experiments including production of inflammatory cytokine and immunoglobulin in collagen induced arthritis model. The results were obtained as follows. CRSST extract shows any cytotoxicity effect on mouse lung fibroblast cells at dose of 400 $\mu\text{g/ml}$. CRSST group shows inhibitory effect on arthritis incidence than control group for six weeks. Arthritis index of CRSST group reduces from 4 weeks (75 \pm 17.4%) to 6 weeks (33.3 \pm 10.0%) compared with control group. In CRSST group, production of cytokines which shows suppressive effect on inflammation (IL-4, IL-10) are increased and which promotes inflammation (TNF- α , INF- γ) are decreased in blood. In CRSST group, production of immunoglobulin (IgG2b, IgG3 and IgM) is reduced compared with control group, and rate of CD4+ and CD3+ T cell is lower in joint and higher in lymph node compared with control group. From above results it could be accepted that CRSST shows anti-arthritis effect via immune system especially through the controlling the inflammatory cytokines and immunoglobins. CRSST could be usefully applied for the prevention and treatment of RA. And also is expected to be clinically helpful on the treatment of RA through modification.

Key words : Ceongryulsaseuptang-kamibang(淸熱瀉濕湯加味方), inflammatory cytokines, immunoglobins, arthritis

서 론

류마티스 관절염 (RA ; Rheumatoid arthritis)은 만성적인 염증 질환으로써 연골과 골조직의 이상을 특징적으로 나타내며, 운동성의 저하뿐만 아니라 심혈관 질환과 뇌경색 등의 심각한 합병증을 유발한다. 특히 RA 환자의 관절강은 synovium을 통과하지 못하는 혈액으로부터 유래된 T cells, B cells, macrophages 와 plasma cells들이 모여 염증과 부종을 일으킨다^{9,35}.

침투된 활액세포는 다양한 cytokine들, 특히 IL-1, IL-6, TNF- α 등을 과잉 생산하며, 고착분자와 단백질분해효소(MMPs)의 유전자 발현 등을 증가시킨다. 이러한 요소들이 다른 염증 세포의 유인과 활성화 및 연골과 골의 쇠퇴에 중요한 역할을 한다⁷.

류마티스 활막은 활성화된 임파구, 대식세포, 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물이 존재하는 것이 특징이며, cytokine의 국소적인 생산물이 RA의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 여겨지고 있다. 예를 들어, 만성적인 염증이 지속되면 T 림프구는 follicle의 형태를 취하기도 하며, 이들은 주로 CD4가 양성인 세포로서 많이 분화되고 활성화 된다⁹.

현재 류마티스 관절염의 약물 치료로는 크게 3가지 범주, 즉 소염진통제 (NSAIDs), 항류마티스제 (DMARDs), 부신피질호르몬제로 구분할 수 있으나, 위장관이나 신장의 장애, 골다공증, 위장관장애, 당뇨병, 고혈압 및 감염 등 다양한 합병증이 발생하고 있다. 따라서 최근에는 류마티스 관절염 치료제의 주 drug target인 inflammatory cytokines 및 matrix metalloproteases (MMPs)들의 조절제를 한약 자원에서 탐색하는 연구가 이루어지고 있다.

한의학에서 RA는 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺 및

* 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr · Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2003/11/10 · 수정 : 2003/12/08 · 채택 : 2004/01/12

痺證 등의 범주에 속하며, 이에 대한 치법으로는 祛風, 散寒, 除濕, 淸熱, 化痰去瘀, 活血通絡 및 滋補肝腎등이 활용되고 있다^{39,43)}.

한약재를 이용한 RA에 대한 실험적 연구로, Shin 등³⁰⁾은 大羌活湯, 安⁴¹⁾, 楊⁴²⁾은 消痰逐水湯, 舒筋立安散이 RA 환자의 염증 Cytokines에 미치는 영향을, Chang 등³⁾은 각종 한약재의 IL-1의 생성 및 활동에 미치는 영향을, 金³⁸⁾은 RA에 응용되는 防己의 효능에 관한 실험적 연구를 보고하였다. 그러나 한방 복합 처방을 이용하여 inflammatory cytokines와 면역세포에 미치는 작용을 동시에 보고한 논문은 많지 않다.

이에 본 실험에서는, 한의학에서 전통적으로 관절염에 사용되어 온 대표적인 처방인 淸熱瀉濕湯⁴⁴⁾에 牛膝, 大腹皮, 木香, 大黃을 가하여 淸熱, 除濕, 鎮痛의 효과를 높인 淸熱瀉濕湯加味方을 이용하여 RA에 대한 억제작용을 실험적으로 증명하고자 하였다. 실험 동물 모델로는 류마티스 관절염과 증상 및 형태적 병변이 유사한 관절염 모델로써⁶⁾, 관절염의 만성적인 염증성 변화에 대한 약리학적 효능을 연구하는데 광범위하게 사용되는^{16,19,34)} 콜라겐 유도 관절염 (CIA ; collagen-induced arthritis) 모델을 이용하였다.

이러한 CIA 모델에서 淸熱瀉濕湯加味方이 염증성 cytokine의 발현, 면역세포 활성화, 임파구 분포의 변화 및 조직화적인 변화에 미치는 영향을 살펴보고, 대조군에 비하여 유의성 있게 류마티스 관절염의 발현을 억제함을 확인하고, 향후 신규 관절염 치료제 개발에 유용한 기초 자료로써 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 한국화학연구소에서 구입한 4주령의 雌性 BALB/c와 Charles River (Japan)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1日中 12時間은 200~300 Lux로 조명하고, 12時間은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

Table 1. Composition of CRSST

韓藥名	生藥名	分量 (g)	韓藥名	生藥名	分量 (g)
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	8	枳殼	Aurantii Fructus	4
黃柏	Phellodendri Cortex	8	香附子	Cyperi Rhizoma	4
蘇葉	Perillae Folium	4	牛膝	Achyranthis Radix	4
白芍藥	Paeonia Radix Alba	4	羌活	Angelicae koreande Radix	4
木瓜	Chaenomelis Fructus	4	大腹皮	Arecae Pericarpium	4
澤瀉	Alismatis Rhizoma	4	木香	Helenii Radix	4
木通	Akebiae Caulis	4	大黃	Rhei Radix et Rhizoma	4
防己	Sinomenii Radix	4	甘草	Radix Glycyrrhizae	4
檳榔	Arecae Semen	4			
TOTAL					56

2) 약재

본 실험에 사용한 淸熱瀉濕湯加味方 (CRSST)의 구성 약재는 대전대학교 부속병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

3) 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), (3, 4, 5)-dimethyl thiazol - (2, 5)-carboxymethoxyphenyl-(2,4)-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), (2,7)-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), bovine type II collagen, complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, RBC lysis solution, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride (MgCl₂), DNase type I 등 Sigma (U.S.A)사 제품을 사용하였으며, collagenase A, penicillinm, streptomycin, amphotericin B는 BM (U.S.A)사 제품을 사용하였고, antibody로는 PE-anti- CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti- CD25, FITC-anti- CD69, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CCR5, PE-anti-Gr-1 FITC-anti- CD11b, PE-anti-Gr-1을 Pharmingen (U.S.A)사 제품으로 사용하였다. 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 기기는 CO₂ incubator (Forma Co., S.A.: Model 3226S), clean bench (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Beckman Co., U.S.A), inverted microscope (Nikon Co., Japan), right microscope (Nikon Co., Japan), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScan (Becton dickinson, U.S.A), rotary vacuum evaporator (Büchi Co., Switzerland), autoclave (Sanyo Co., Japan), titer plate shaker (Labline Inst., U.S.A), camera (Nikon Co., Japan), microcentrifuge (한일과학, Korea) 등을 사용하였다.

4. 추출물 분리

淸熱瀉濕湯加味方 (CRSST) 3첩 분량에 각각 증류수 2000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축한 뒤, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 CRSST를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

5. CII 接種과 CRSST 投與

DBA/1J 생쥐 5마리를 한 군으로 관절염을 유발시키지 않은 正常群 (wilde type, WT)과 CIA로 유발시킨 약제를 투여하지 않은 對照群과 CRSST 投與群으로 나누고, 100 μg의 bovine type II collagen과 0.1ml Complete Freund's Adjuvants를 혼합하여 생쥐 꼬리의 등위 부분에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하였다.

6. Arthritis index (AI) and incidence 分析

2次 CII 接種 後 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발 (paw)에서 關節炎 徵候를 아래의 基準으로 發病率 (incidence, %)을 決定하였다. 0 = no arthritis, 1 = small degree of arthritis, 2 = light swelling, 3 = medium swelling, 4 = severe swelling, 5 = severe

swelling and non-weight-bearing, 그리고 CIA 誘發 程度를 1 週日 間隔으로 記錄하였다.

Table. 2. Arthritis Incidence

단 계	유 발 정도
0	no arthritis
1	small degree of arthritis
2	light swelling
3	medium swelling
4	severe swelling
5	severe swelling and non-weight-bearing

7. 비장 무게의 변화

1차 CIA 접종 후 70일에 실험을 종료한 후 ethyl ether로 마취시킨 후 비장을 분리하여 electric chemical balance로 0.01g 까지 측정하였다.

8. 폐와 림프내 형광 유세포 분석

DBA/1J 생쥐에서 관절 (joint)을 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI1640)을 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 얻어진 관절세포 부유액을 1% FBS의 FACS 완충 용액에 넣어 준비하고, 같은 동물에서 림프절 (Lymph node)을 분리하여 100 mesh로 림프세포를 분리하였다. 분리된 관절세포와 림프세포에 적혈구 용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 °C에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CCR5, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, PE-anti-Gr-1을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4e⁺/CD25⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD3e⁺/CDB220⁺, CD3e⁺/CCR5⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포수를 백분율 (%)로 분석하였다.

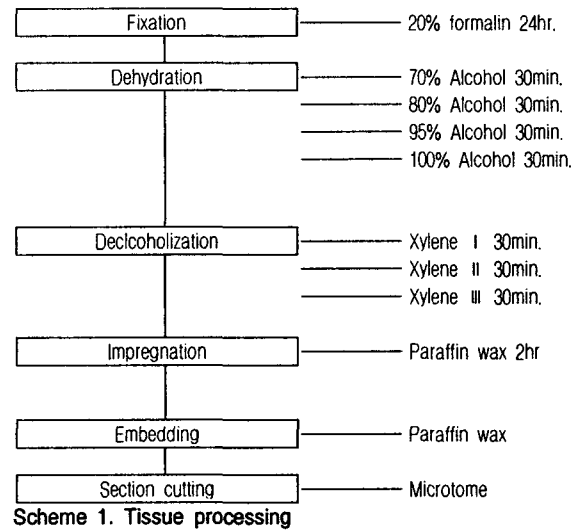
9. 혈청내 IL-4, IL-10, IFN-γ, IgG3, IgG2b 및 IgM의 분석

IL-4, IL-10, IFN-γ, 그리고 RF인 IgG3, IgG2b와 IgM 혈청 측정은 CIA 생쥐 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 CIA생쥐의 혈청 100 μl (1/100 dilution)씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

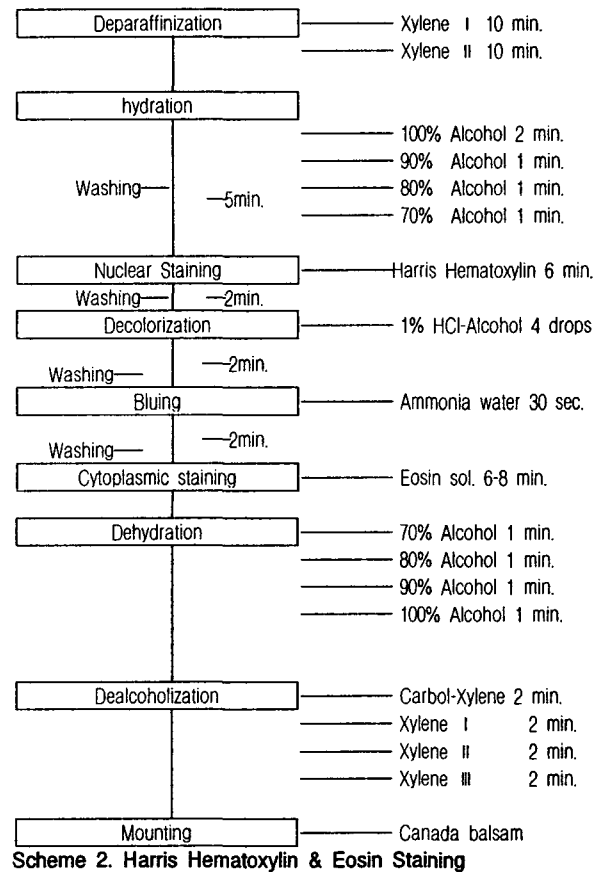
10. 병리 조직검사

40 일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, scheme 1과 같은 과정을 거쳐 포맷하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin &

Eosin와 collagen deposition염색인 Masson-Trichrome 염색을 하였다.



Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

결 과

1. 세포 독성 실험

Mouse lung fibroblast cell (mLFC)에 대한 세포독성 평가에서는 對照群에 비해 CRSS의 400, 200, 100, 10, 1 μg/ml 농도에서 각각 94.4±3.7, 96.0±4.8, 97.4±5.2, 99.1±4.8, 99.9±3.4%의 세포

생존율이 나타났고, Human lung fibroblast cell (hFLS)에서는 400, 200, 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 93.8 ± 4.4 , 94.2 ± 3.9 , 98.6 ± 4.0 , 97.4 ± 3.1 , $99.5 \pm 4.6\%$ 로 나타났다.

2. 관절염 발생률에 미치는 영향 (Arthritis index 분석)

DBA/1J 생쥐에 2차 CII 접종 (booster)한 후 6주 동안 관절염 유발 생쥐의 4개의 발에 나타나는 관절염 유발 정도를 6단계로 구분하여 매주 1회 측정된 결과, 對照群은 1주째 3.3 ± 0.49 , 3주째 15 ± 0.4 , 4주째 17 ± 1.33 으로 증가된 후 6주째 10.7 ± 1.09 로 약간 자연 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. CRSST 投與群은 1주째 3.33 ± 1.75 , 3주째 12 ± 2.52 , 4주째 7.67 ± 1.46 으로 감소된 후 6주째 1.66 ± 0.81 로 현저한 AI치의 감소효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

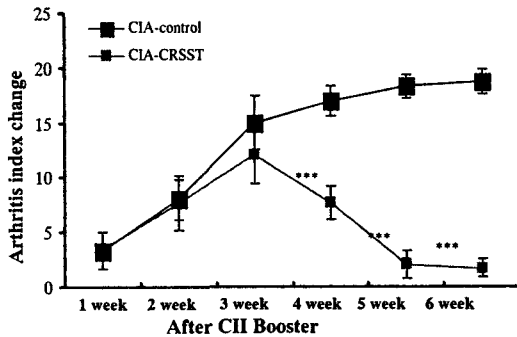


Fig. 1. Effects of CRSST on Arthritis index and histopathologic grade of arthritis in CIA mice. CIA-control: Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). CIA-control: Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. 관절염 발병율 (incidence)

AI 측정과 동시에 4다리에 대한 관절염 발병율을 측정한 결과, 對照群은 1주째 50% 이었고 2주째부터 6주까지 100% 유발되었다. CRSST 投與群은 1주째 50%, 3주째 $91.7 \pm 10.1\%$ 이었다가 4주째부터 $75 \pm 17.4\%$ 로 감소하여 6주째에는 $33.3 \pm 10.0\%$ 로 현저히 감소하였다(Fig. 2).

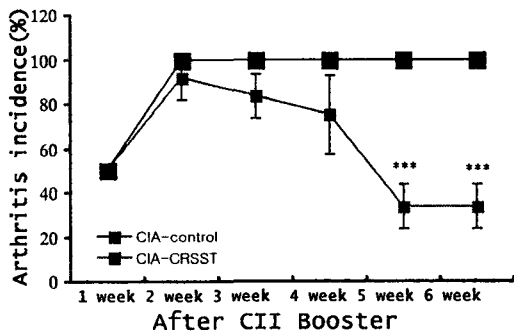


Fig. 2. Effects of CRSST on Incidence and histopathologic grade of arthritis in CIA mice. CIA-control: Collagen-induction Arthritis (control) CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg) Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4. 脾臟 무게 변화에 미치는 영향

脾臟의 무게는 正常群이 94 ± 9.00 mg인데 비하여, 對照群이 145 ± 32.00 mg으로 증가하였고, CRSST 投與群은 94 ± 9.70 mg으로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.01)를 나타내었다.

Table 3. Effects of CRSST on Spleen Weight in Murine CIA.

Drugs	N	Spleen weight (mg)	Decrease (%)
Normal	8	94 ± 9.00	
Control	8	145 ± 32.00	
CRSST	8	94 ± 9.70 **	35.2

WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

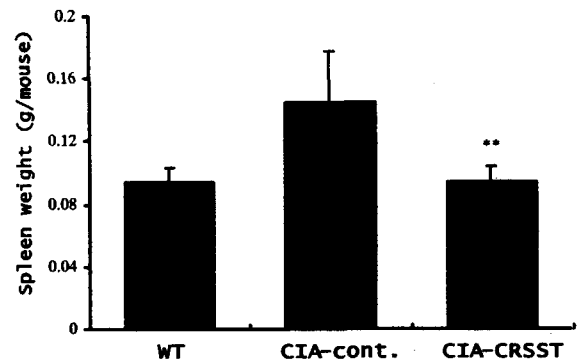


Fig. 3. Prophylactic effects of CRSST on the spleen weight in Murine CIA. WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 正常群이 6.3 ± 1.24 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 12.5 ± 2.76 (pg/ml)로 큰 폭으로 증가하였고, CRSST 投與群 역시 22.4 ± 3.01 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 增加 (p<0.05)를 나타내었다 (Table 4, Fig 4).

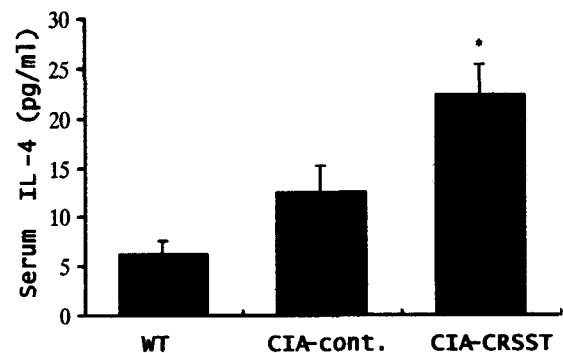


Fig. 4. Effects of CRSST on IL-4 level in the serum of CIA mice. IL-4 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Data are the mean serum IFN-g concentration levels (picograms per milliliter) ± SE (n=5) in each group. No statistically significant differences from the vehicle control were observed by the treatment with these agents. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Table 4. Inhibitory Effect of CRSST on the IL-4 Production in Murine CIA

Drugs		IL-4 production (pg/ml)
DBA/1J Normal		6.3±1.24
Murine CIA	Control	12.5±2.76
	CRSST	22.4±3.01 *

6. IL-10 생성량에 미치는 영향

IL-10 생성량은 正常群이 21.4±5.2 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 27.5±15.8 (pg/ml)로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 147.8±18.7 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 增加 (p<0.01)를 나타내었다 (Table 5, Fig. 5).

Table 5. Inhibitory Effect of CRSST on the IL-10 Production in Murine CIA

Drugs		IL-10 production (pg/ml)
DBA/1J Normal		21.4±5.2
Murine CIA	Control	27.5±15.8
	CRSST	147.8±18.7 **

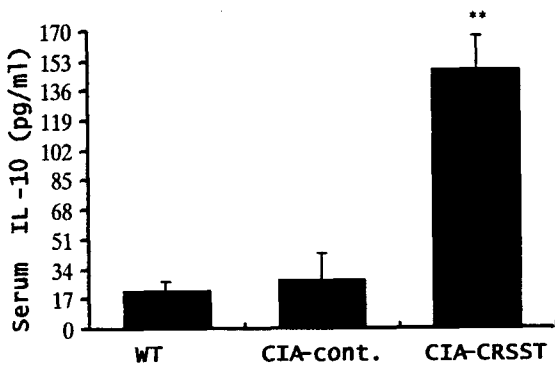


Fig. 5. Effects of CRSST on IL-10 level in the serum of CIA mice. IL-10 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/g). Data are the mean serum IL-10 concentraton levels (picograms per milliliter)±SE (n=5)in each group. No statistically significant differences from the vehicle control wre observed by the treatment with these agent. Statistically significant value compared with ontrol group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

7. INF-γ 생성량에 미치는 영향

INF-γ 생성량은 正常群이 7.5±0.41 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 36.9±2.51 (pg/ml)로 큰 쪽으로 增加하였고, CRSST 投與群은 14.5±3.00 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.001)를 나타내었다. (Table 6, Fig. 6).

Table 6. Inhibitory Effect of CRSST on the INF-γ Production in Murine CIA

Drugs		INF-γ production (pg/ml)
DBA/1J Normal		7.5±0.41
Murine CIA	Control	36.9±2.51
	CRSST	14.5±3.00 ***

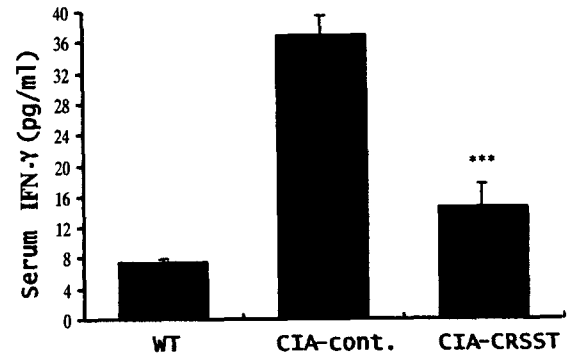


Fig. 6. Effects of CRSST on INF-γ level in the serum of CIA mice. INF-γ concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Data are the mean serum IL-4 concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. No statistically significant differences from the vehicle control were observed by the treatment with these agents. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

8. IgG2b 생성량에 미치는 영향

IgG2b 생성량은 正常群이 2.5±0.41 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 8.5±1.57 (pg/ml)로 큰 쪽으로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 3.8±0.82 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.01)를 나타내었다 (Table 7, Fig. 7).

Table 7. Inhibitory Effect of CRSST on the IgG2b Production in Murine CIA

Drugs		IgG2b production (pg/ml)
DBA/1J Normal		2.5±0.41
Murine CIA	Control	8.5±1.57
	CRSST	3.8±0.82 **

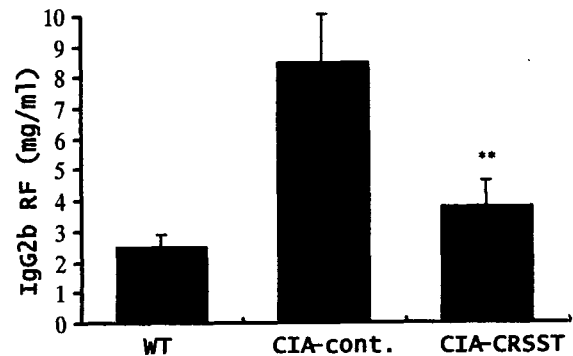


Fig. 7. Effects of CRSST on immunoglobulinG2b in the serum rheumatoid factor (RF) of CIA mice. IgG2b concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Data are the mean serum IgG2b concentration levels (micrograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. No statistically significant differences from the vehicle control were observed by the treatment with these agents. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

9. IgG3 생성량에 미치는 영향

IgG3 생성량은 正常群이 1.4±0.15 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 8.7±1.25 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 4.3±0.72 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.01)를 나타내었다 (Table 8, Fig. 8).

Table 8. Inhibitory Effect of CRSST on the IgG3 Production in Murine CIA

Drugs		IgG3 production (pg/ml)
DBA/1J Normal		1.4±0.15
Murine CIA	Control	8.7±1.25
	CRSST	4.3±0.72 **

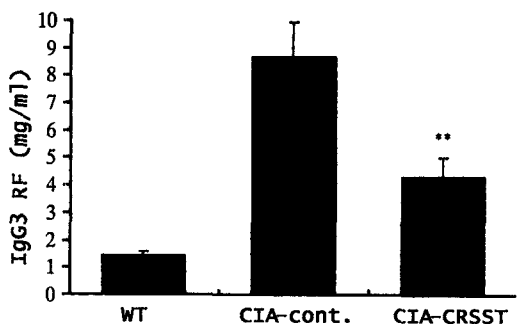


Fig. 8. Effects of CRSST on immunoglobulinG3 in the serum rheumatoid factor (RF) of CIA mice. IgG3 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice, CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control), CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Data are the mean serum IgG3 concentration levels (micrograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. No statistically significant differences from the vehicle control were observed by the treatment with these agents. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

10. IgM 생성량에 미치는 영향

IgM 생성량은 正常群이 1.7±0.09 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 6.7±1.03 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 3.7±0.9 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.05)를 나타내었다 (Table 9, Fig. 9).

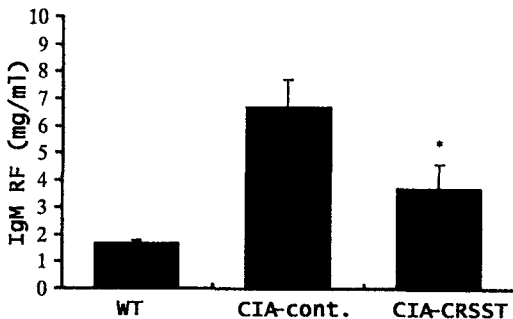


Fig. 9. Effects of CRSST on immunoglobulin M in the serum rheumatoid factor (RF) of CIA mice. Ig M concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice, CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control), CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg). Data are the mean serum Ig M concentration levels (micrograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. No statistically significant differences from the vehicle control were observed by the treatment with these agents. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Table 9. Inhibitory Effect of CRSST on the IgM Production in Murine CIA

Drugs		IgM production (pg/ml)
DBA/1J Normal		1.7±0.09
Murine CIA	Control	6.7±1.03
	CRSST	3.7±0.90 *

11. Joint 내의 CD4⁺/CD25 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD4⁺/CD25의 數는 각각 正常群에서 0.00 (%), 對照群에서 0.32 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.51 (%)로 측정되었다 (Table 10, Fig. 10).

Table 10. Effects of CRSST on the Percentage of CD4⁺/CD25⁺-gated Cells in Joints of CIA Mice.

Drugs	N	CD4 ⁺ /CD25 (%)
Normal	10	0.00
Control	10	0.32
CRSST	10	0.51

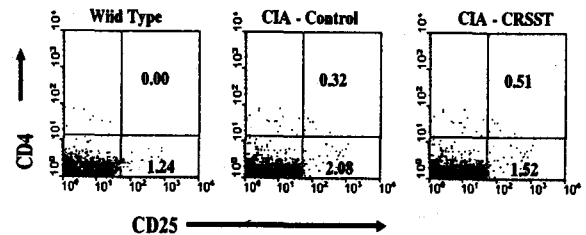


Fig. 10. Effects of CRSST on the percentage of CD4⁺/CD25⁺-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice, CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control), CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

12. Joint 내의 CD3⁺/CD69 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD3⁺/CD69의 數는 각각 正常群에서 0.11 (%), 對照群에서 0.33 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.06 (%)로 측정되었다 (Table 11, Fig. 11).

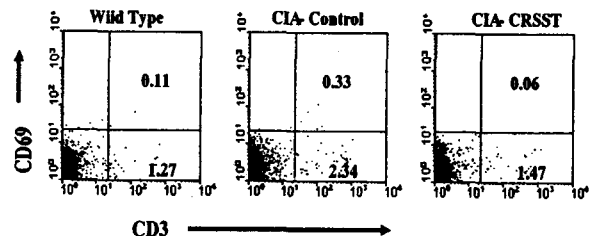


Fig. 11. Effects of CRSST on the percentage of CD3⁺/CD69⁺-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice, CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control), CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

Table 11. Effects of CRSST on the Percentage of CD3⁺/CD69⁺-gated Cells in Joints of CIA Mice.

Drugs	N	CD3 ⁺ /CD69 ⁺ (%)
Normal	10	0.11
Control	10	0.33
CRSST	10	0.06

13. Joint 내의 CD4⁺/CD8⁺ 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD4⁺와 CD8⁺의 수는 각각 正常群에서 0.26, 1.22 (%), 對照群에서 0.68, 2.58 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.37, 1.05 (%)로 측정되었다 (Table 12, Fig. 12).

Table 12. Effects of CRSST on the Percentage of CD4⁺ and CD8⁺-gated Cells in Joints of CIA Mice.

Drugs	N	CD4 (%)	CD8 ⁺ (%)
Normal	10	0.26	1.22
Control	10	0.68	2.58
CRSST	10	0.37	1.05

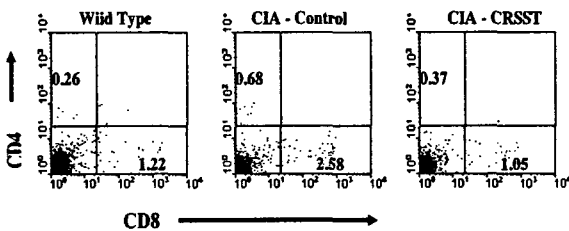


Fig. 12. Effects of CRSST on the percentage of CD4⁺/CD8⁺-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

14. Joint 내의 CD3e⁺와 B220⁺ 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD3e⁺와 B220⁺의 수는 각각 正常群에서 0.53, 71.4 (%), 對照群에서 1.52, 81.9 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.53, 74.8 (%)로 측정되었다 (Table 13, Fig. 13).

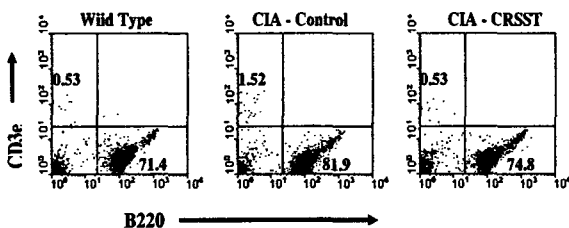


Fig. 13. Effects of CRSST on the percentage of CD3e⁺/B220⁺-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

Table 13. Effects of CRSST on the Percentage of CD3e⁺ and B220⁺-gated Cells in Joints of CIA Mice

Drugs	N	CD3e ⁺ (%)	B220 (%)
Normal	10	0.53	71.4
Control	10	1.52	81.9
CRSST	10	0.53	74.8

15. Joint 내의 CD3e⁺와 CCR5 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD3e⁺와 CCR5의 수는 각각 正常群에서 0.47, 1.66 (%), 對照群에서 1.05, 2.69 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.26, 1.43 (%)로 측정되었다 (Table 14, Fig. 14).

Table 14. Effects of CRSST on the Percentage of CD3e⁺ and CCR5-gated Cells in Joints of CIA Mice.

Drugs	N	CD3e ⁺ (%)	CCR5 (%)
Normal	10	0.47	1.66
Control	10	1.05	2.69
CRSST	10	0.26	1.43

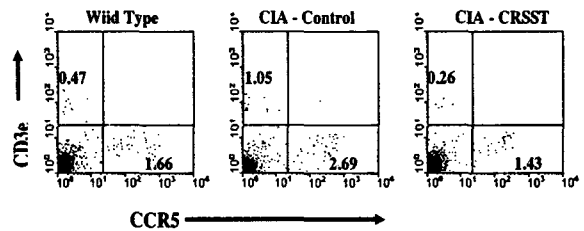


Fig. 14. Effects of CRSST on the percentage of CD3e⁺/CCR5-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

16. Joint 내의 CD11b⁺/Gr-1⁺ 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD11b⁺/Gr-1⁺ 수는 正常群에서 13.0 (%), 對照群에서 48.1 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 26.2 (%)로 측정되었다 (Table 15, Fig. 15).

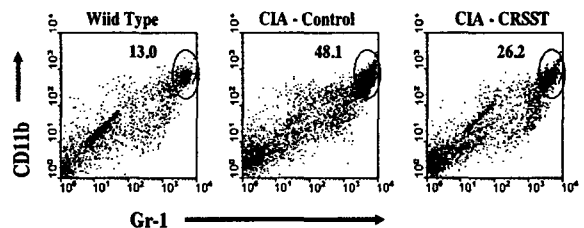


Fig. 15. Effects of CRSST on the percentage of CD11b⁺/Gr-1⁺-gated cells in joints of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse Joint cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

Table 15. Effects of CRSST on the Percentage of CD11b⁺/Gr-1⁺-gated Cells in Joints of CIA Mice.

Drugs	N	CD11b ⁺ /Gr-1 ⁺ (%)
Normal	10	13.0
Control	10	48.1
CRSST	10	26.2

17. Lymph node 내의 CD3e⁺와 B220 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD3e⁺와 B220의 數는 正常群에서 75.6, 20.9 (%), 對照群에서 52.1, 42.6 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 68.4, 29.1 (%)로 측정되었다 (Table 16, Fig. 16).

Table 16. Effects of CRSST on the Percentage of CD3e⁺/B220⁺-gated Cells in Lymph node of CIA Mice.

Drugs	N	CD3e ⁺ (%)	B220 (%)
Normal	10	75.6	20.9
Control	10	52.1	42.6
CRSST	10	68.4	29.1

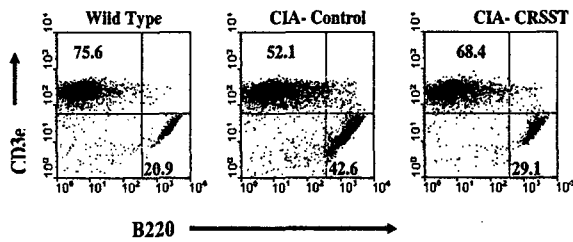


Fig. 16. Effects of CRSST on the percentage of CD3e⁺/B220⁺-gated cells in lymph node of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse lymph node cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

18. Lymph node 내의 CD3e⁺/CD69 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD3e⁺/CD69의 數는 正常群에서 4.99 (%), 對照群에서 6.41 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 4.66 (%)로 측정되었다 (Table 17, Fig. 17).

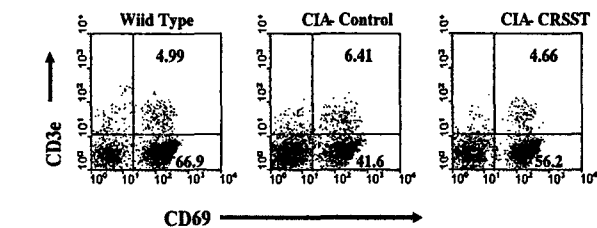


Fig. 17. Effects of CRSST on the percentage of CD3e⁺/CD69⁺-gated cells in lymph node of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse lymph node cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

Table 17. Effects of CRSST on the Percentage of CD3e⁺/CD69⁺-gated Cells in Lymph node of CIA Mice.

Drugs	N	CD3e ⁺ /CD69 (%)
Normal	10	4.99
Control	10	6.41
CRSST	10	4.66

19. Lymph node 내의 CD4⁺/CD25⁺ 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD4⁺/CD25의 數는 正常群에서 5.65 (%), 對照群에서 4.35 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 4.94 (%)로 측정되었다 (Table 18, Fig. 18).

Table 18. Effects of CRSST on the Percentage of CD4⁺/CD25⁺-gated Cells in Lymph node of CIA Mice.

Drugs	N	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ (%)
Normal	10	5.65
Control	10	4.35
CRSST	10	4.94

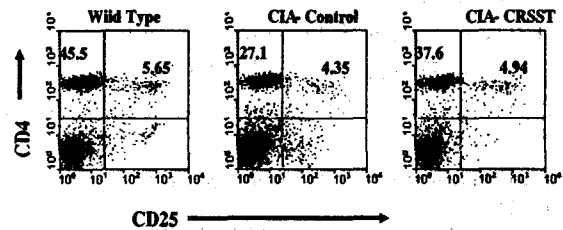


Fig. 18. Effects of CRSST on the percentage of CD4⁺/CD25⁺-gated cells in lymph node of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse lymph node cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

20. Lymph node 내의 CD4e⁺와 CD8⁺ 발현에 미치는 영향

免疫細胞 中 CD4⁺와 CD8의 數는 正常群에서 50.5, 20.2 (%), 對照群에서 28.4, 15.0 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 41.2, 18.3 (%)로 측정되었다 (Table 19, Fig. 19).

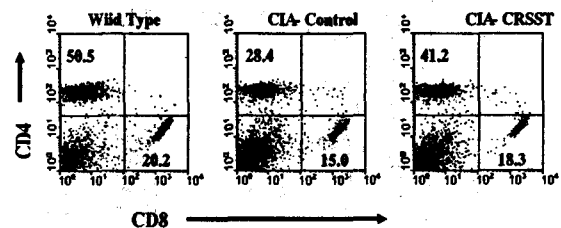


Fig. 19. Effects of CRSST on the percentage of CD4e⁺/CD8⁺-gated cells in lymph node of CIA mice. After CII booster 6 weeks, CIA (CIA-control) mouse lymph node cells (5x10⁵ cell/ml) were isolated, and the joints cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Wild Type : Normal DBA/1j mice. CIA-control : Collagen-induction Arthritis (control). CIA-CRSST : CIA + CRSST (320 mg/kg)

Table 19. Effects of CRSST on the Percentage of CD4e⁺ and CD8⁺ gated Cells in Lymph node of CIA Mice.

Drugs	N	CD4e ⁺ (%)	CD8 (%)
Normal	10	50.5	20.2
Control	10	28.4	15.0
CRSST	10	41.2	18.3

21. 혈청내 IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 正常群이 35 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 146 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群은 31 (pg/ml)로 對照群에 비하여 減少를 나타내었다 (Table 20, Fig. 20).

Table 20. Inhibitory Effect of CRSST on the IL-6 Production in Murine CIA

Drugs	IL-6 production (pg/ml)
DBA/1J Normal	35
Murine CIA Control	146
Murine CIA CRSST	31

22. 혈청내 TNF-α 생성량에 미치는 영향

TNF-α 생성량은 正常群이 15 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 187 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群은 89 (pg/ml)로 對照群에 비하여 減少를 나타내었다 (Table 21, Fig. 20).

Table 21. Inhibitory Effect of CRSST on the TNF-α Production in Murine CIA

Drugs	TNF-α production (pg/ml)
DBA/1J Normal	15
Murine CIA Control	187
Murine CIA CRSST	89

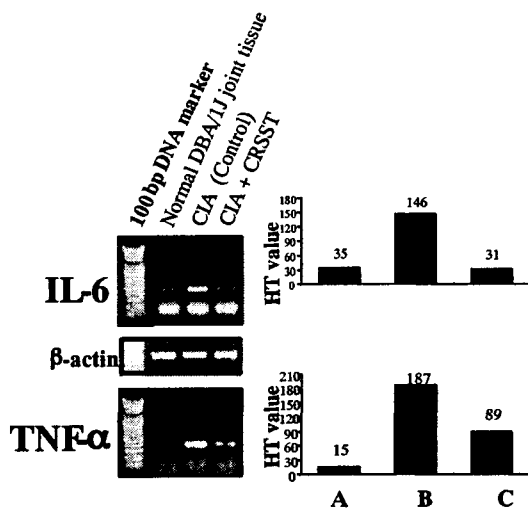


Fig. 20. Effects of CRSST on cytokines mRNA expression in joint tissue of CIA mice. A : Normal DBA/1j mice. B : Collagen-induction Arthritis (control). C : CIA + CRSST (320 mg/kg). Amplified obesity mRNA PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control (b-actin) and the analysis (HT) was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

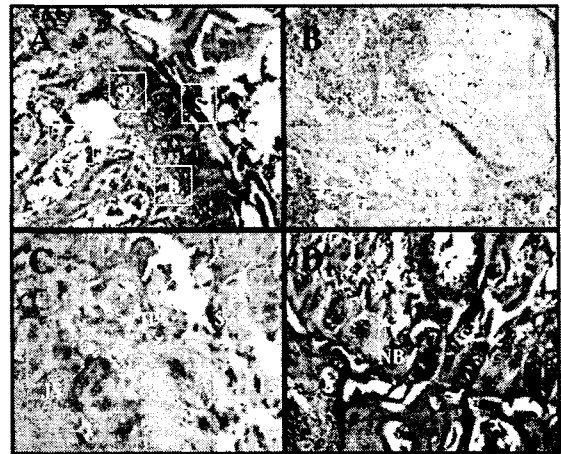


Fig. 21. The histopathology of joints (H&E staining) of murine CIA. A : Normal DBA/1j mice. B and C : Collagen-induction Arthritis (control). D : CIA + CRSST (320 mg/kg). DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology as described in Materials and Methods. Cross-sections of the Hindpaw from a Murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse (A), control: murine CIA (B and C), CRSST(D) were analysis with histopathology of joints of Murine CIA. Intraarticular exudate, marginalerosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel (B and C). B, bone; CPJ, cartilage pannus junction; P, pannus; S, synovium; NB, new bone; IP, invasion pannus; JS, joint space, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: X 20.

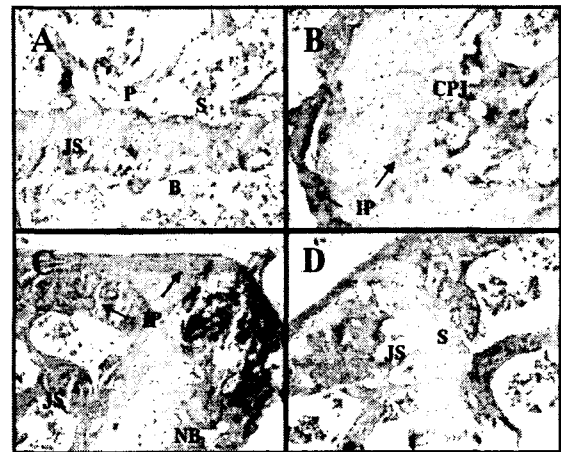


Fig. 22. The histopathology of joints (Masson-trichrome staining) of murine CIA. A : Normal DBA/1j mice. B and C : Collagen-induction Arthritis (control). D : CIA + CRSST (320 mg/kg). DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology as described in Materials and Methods. Cross-sections of the Hindpaw from a Murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse (A), control: murine CIA (B and C), CRSST(D) were analysis with histopathology of joints of Murine CIA. Intraarticular exudate, marginalerosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel (B and C). B, bone; CPJ, cartilage pannus junction; P, pannus; S, synovium; NB, new bone; IP, invasion pannus; JS, joint space, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: X 20.

23. 조직학적 변화

1) H-E 염색 결과

正常群의 관절 조직은 관절연골을 형성하는 연골세포는 기질과 함께 잘 보존되어 있고 주변에는 연골막과 윤활막들이 잘 보존되어 있었다 (Fig. 21). 對照群은 연골관절 가까이에서는 연골세포들의 뚜렷한 증식을 관찰 할 수 없었고, 반대로 연골하의

골관 부위에서는 연골세포에서 과사소견과 함께 주변에서는 기질물질이 축적되었고, 염증세포의 출현과 섬유화를 동반하는 병변 소견들이 관찰되었다. 한편 CRSST 投與群은 正常群과 유사한 관절의 연골상태로 연골세포의 배열 및 기질의 축적 정도는 정상 상태를 보였고, 염증세포의 출현이나 섬유성 병변도 對照群보다 현저히 減少하였다.

2) MT 염색 결과

교원섬유 (collagen fiber)의 축적 정도를 알아보기 위해 실시한 MT 염색결과 正常群에서는 연골부위에서 주로 관찰되었다. 연골을 형성하는 연골세포의 기질물질인 교원섬유가 주로 염색성을 보였다 (Fig. 22). 對照群에서는 연골의 기질뿐만 아니라 섬유성 병변이 관찰되는 연골하 골관부위나 윤활막 가까이에서도 교원섬유의 염색성이 강하게 관찰되었다. CRSST 投與群에서는 正常群에 비해서는 연골하 골관부위나 윤활막 주변에서 다소 강한 염색성을 보였으나 實驗群과 비교해서는 전체적인 염색 발현 부위나 강도는 減少하였다.

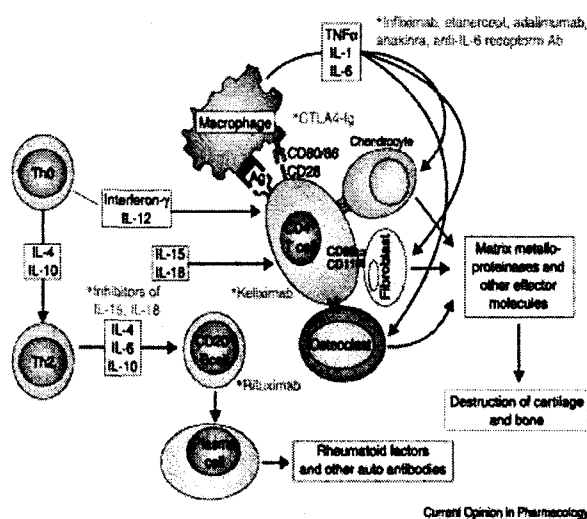
고찰

RA는 원인불명의 만성 전신성 多發臟器질환이다. 임상적으로 RA는 만성 다발성 관절염으로 특징 지워진다. 많은 경우 활막염이 나타날 때까지 疲勞, 食欲不振, 全身衰弱, 模糊한 筋肉, 骨格症勢 등이 시작된다. 이런 전구증세는 數周내지 數個月 持續되며 診斷을 어렵게 한다. 全身症勢는 몇 개의 관절 특히 손, 손목, 무릎, 발의 관절로부터 점차적으로 나타나고 對稱樣相을 갖는다. 약 10%의 患者에서 發病이 急性으로 나타나고 多發性關節炎이 빠르게 발전하며 熱, 淋巴腺炎, 脾臟肥大 등의 全身症狀를 호소한다³⁴⁾.

일부 환자에서는 증상이 초기에는 한 關節 또는 적은 수의 關節에만 국한되어 나타날 수 있다. 一部에서는 侵犯關節의 분포가 非對稱的인기는 하지만 대부분의 환자는 對稱的 分포를 나타낸다. 炎症은 조직 손상에 대한 정상적인 방어기전으로서 정상적으로는 炎症誘發要因을 제거, 손상된 조직의 治愈, 機能의 回復를 가져오지만, 류마티스 關節炎과 같은 慢性疾患에서는 원인의 제거가 불가능하여 결국 계속되는 염증으로 인하여 조직의 손상에 따른 기능의 손실을 가져온다²⁴⁾.

RA의 특징적 양상은 말단가동관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염이라 할 수 있으며, 이 질환의 특징은 활막의 過增殖, 血管形成, 관절연골과 軟骨下 골의 침식 등이며, 결국 關節의 변형을 가져온다.

류마티스 활액조직은 혈관내막 대식세포와 섬유아세포양 활액세포의 숫자증가와 T세포, 세포질세포, 대식세포, 기타 활액내 세포들의 축적으로 특징 지워진다. 침투된 활액세포는 다양한 cytokines들, 특히 IL-1, IL-6, TNF- α 등을 과잉생산하며, 고착분자와 단백질분해효소 (MMPs)의 유전자 발현등으로 생산을 증가시킨다. 이러한 요소들이 다른 염증세포의 誘因과 활성화 및 연골과 골의 쇠퇴에 중요한 역할을 한다⁷⁾.



RA에서는 T림프구 이외에도 B림프구, plasma cell, 비만세포, 대식세포의 침윤도 관찰된다. 류마티스 활막은 활성화된 림프구, 대식세포, 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물이 존재하는 것이 특징이며, 이들 cytokine의 국소적인 생산물이 RA의 병리적 임상적 양상의 원인으로 생각되고 있다. 이들 cytokine으로는 T림프구에서 나온 IL-2, IL-6, 과립세포-대식세포 colony 자극요소 (GM-CSF), TNF- α , transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 있고, 활성화된 대식세포에서 유래하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF, transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 있으며, 이 외에 fibroblast, endothelial cell 등에서 분비하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF 등이 있다. 즉, RA 조직에서 cytokine mRNA와 protein의 분석은 모든 환자에서 IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF 등과 같은 proinflammatory cytokine과 IL-8과 같은 chemokine이 풍부하다¹⁷⁾. 이들 cytokine의 활성도가 류마티스 활막염의 여러 양상인 滑膜組織炎症, 滑膜液炎症, 滑膜增殖, 軟骨과 骨의 손상 등과 RA에서의 전신 양상을 나타내는 원인으로 생각된다.

RA의 정확한 원인과 기전은 아직 알려지지 않았으나, 分子生物學 기술의 發達과 함께 새로운 치료 target이 發見되었으며, cell-subsets와 cytokines들이 注目되고 있다²⁵⁾. 이들은 모두 RA에 있어서 염증 및 관절 구조물의 파괴를 촉진시키는 구성 요소들이다. 따라서 류마티스 관절염 치료제의 주 drug target인 inflammatory cytokines 및 Inflammatory cells을 직접 길항하는 약제를 만들기 위한 연구가 활발하다²⁷⁾. 이중 proinflammatory cytokine의 길항물질을 이용한 Interleukin-1 수용체의 antagonist와 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 길항물질로서 soluble TNF- α 수용체와 항 TNF- α 항체 및 유전자 치료가 많이 기대되고 있다^{8,20)}.

현재 약물치료는 크게 3가지 범주, 즉 소염진통제 (NSAIDs), 항류마티스제제 (DMARDs), 부신피질호르몬제제로 구분할 수 있다. 그러나 NSAIDs는 위장관이나 신장의 장애를 초래하고, 부신피질호르몬제중 Glucocorticoid는 骨多孔症, 胃腸管障礙, 糖尿病, 高血壓, 感染, 의인성쿠싱증후군 등 다양한 合併症이 발생하

며, 항류마티스제제 (DMARDs) 또한 不作用이 나타나고 있다. 따라서 최근에는 천연약물을 이용한 치료제 개발도 활발한데, 예를 들어 *Tripterygium wilfordii hook F*에 대하여 Ramgolam은²⁶⁾ RA에서의 면역항진 억제효과를, Kazuhito Asano 등¹⁴⁾은 CIA 모델에서의 면역억제 효과를, Tao 등³³⁾은 이를 이용한 임상 1기 시험을 보고하였다.

이에 본 실험에서는, 신규 항관절염 처방을 개발하기 위한 기본 작업으로 한의학에서 전통적으로 濕熱脚氣, 風濕病에 사용되어온 代表的인 處方인 淸熱瀉濕湯加味方을 이용하여 關節炎 抑制作用을 실험적으로 밝히고자 하였다. 淸熱瀉濕湯은 東醫寶鑑에 기재된 處方으로써⁴⁴⁾, 濕熱, 脚氣, 腫痛을 治療한다고 제시되었으며, 실제 본 實驗에 사용된 淸熱瀉濕湯加味方은 東醫寶鑑의 淸熱瀉濕湯에 牛膝, 大腹皮, 木香, 大黃을 加하여 淸熱, 除濕, 鎮痛의 效果를 높인 것이다³⁷⁾.

실험 동물모델로는 류마티스 關節炎과 증상 및 形態의 病變이 유사한 關節염 모델인 콜라겐 유도 關節염 (CIA ; collagen-induced arthritis)을 이용하였다⁶⁾. CIA는 關節염의 만성적인 염증성 변화에 대한 약리학적 효능을 연구하는데 광범위하게 사용되어지고 있다^{2,16,19,22,34)}. 實驗은 크게 inflammatory cytokine 調節作用, 過剩免疫 (T, B Cell) 抑制作用, 組織學的 변화 관찰의 세 部分으로 나누어져 실행되었다.

1. 炎症性 Cytokines 調節作用

RA에서는 炎症反應을 誘導하는 cytokines의 생산에 덧붙여서 cytokines 활동을 저해하는 특이억제물질 (inhibitor)이 생산되며, T細胞 활성화와 증식, B細胞 분화와 염증부위의 이동 등이 일어나고, 동시에 특징적인 류마티스 염증반응을 억제하는 cytokines의 생산 등이 이루어진다³⁹⁾.

RA에 영향을 주는 많은 炎症性 cytokines과 matrix metalloprotease (MMPs)는 DNA-binding protein과 신호 전달 경로에 의해 조절된다. 炎症性 cytokines과 고착분자의 유전자 발현은 다양한 전사인자에 의해 조절되며, 이중의 하나인 NF-κB는 炎症過程에 중요한 역할을 한다. NF-κB에 의해 유도된 증가된 cytokine들은 關節에서 백혈구를 끌어들이는 혈관고착분자의 발현과 細胞外 기질을 쇠퇴시키고 파괴시키는 MMP를 증가시킨다. NF-κB는 세포질에서 비활성화된 상태로 있고, 세포질 내에서 NF-κB의 억제단백질인 IκB와 결합하고 있으며, 여러 자극들 (IL-1, TNF-α, PDGF)에 의해서 활동을 시작한다¹³⁾.

Cytokine에 의한 RA 억제 기전에는 IL-4, IL-6, IL-10, 그리고 IL-13등을 들 수 있다. IL-4, IL-10, 그리고 IL-13은 RA 환자에서 IL-1β와 TNF-α, IL-6, IL-8의 전사를 억제하여 과잉 생산을 억제시키고, 특히 IL-10은 IL-1β와 TNF-α의 수준을 억제하는데 가장 효과적이다. IL-4는 cytokine mRNA의 감소 비율을 증가시키며, IL-4와 IL-13은 IL-1 억제제인 IL-1Ra의 분비를 강하게 증가시킨다²¹⁾.

또한 IL-10은 T細胞, 大食細胞, 단핵구, 수지상세포 등에서는 免疫抑制機能을 하고, B세포, 내피세포 등에서는 면역자극 작용의 상반된 작용을 가진다¹⁵⁾. IL-6의 항류마티스효과 작용은 NF-κ

B의 억제로 나타나며, IL-1R 길항제나 수용성 TNFR, IL-10, glucocorticoids, protease inhibitor, cytokine signaling protease의 억제제 등 많은 炎症증 기능의 factor 발현을 만든다^{18,32)}. 반면 Proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-17, TNF-α는 MMP-3, MMP-1로 mRNA와 protein을 생산한다¹²⁾. NF-κB는 炎症성 유전자 전사의 중요한 조절자이고, RA 활막에서 활성화된다. NF-κB는 안정된 세포에서는 억제제 IκB에 의해 비활성화된 세포질로서 유지된다. IL-1, TNF-α는 NF-κB-inducing kinase (NIK)를 자극하고, NIK는 I-κB kinase (IKKs)를 인산화시키고 활성화시킨다. 즉 NF-κB의 활성화는 내피세포 고착분자의 발현을 증가시키고, IL-1, IL-6, TNF-α 등의 조절에 중요한 역할을 한다^{1,31)}.

실험 결과 혈청 내에서의 TNF-α 생성량은 正常群이 15 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 187 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群은 89 (pg/ml)로 對照群에 비하여 52.4%의 減少를 나타내었다 (Table 19, Fig.20). 또한 INF-γ 생성량은 正常群이 7.5±0.41 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 36.9±2.51 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群은 14.5±3.00 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.001)를 나타내었다. (Table 6, Fig 6). 한편, RA에 대한 억제 작용을 나타내는, IL-4, IL-6, IL-10 등에 대한 CRSST의 작용에서는, 혈청내에서의 IL-6 생성량은 正常群이 35 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 146 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群은 31 (pg/ml)로 對照群에 비하여 78.8%의 減少를 나타내었다 (Table 18, Fig.20). 반면에 IL-4 생성량은 正常群이 6.3±1.24 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 12.5±2.76 (pg/ml)로 큰 폭으로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 22.4±3.01 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 增加 (p<0.05)를 나타내었다 (Table 4, Fig 4). 또한 IL-10 생성량도 正常群이 21.4±5.2 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 27.5±15.8 (pg/ml)로 增加하였고, CRSST 投與群 역시 147.8±18.7 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性있는 增加 (p<0.05)를 나타내었다 (Table 5, Fig. 5).

이상의 결과를 통해서 볼 때, CRSST이 RA에서 炎症反應을 抑制하는 cytokine들 (IL-4, IL-6, IL-10등) 中, IL-4와 IL-10의 발현을 촉진시킴을 알 수 있으며, 그 결과 대표적인 炎症 유발 cytokine인 TNF-α와 INF-γ의 생성량을 감소시킨 것으로 추측할 수 있다.

2. 過剩免疫 (T, B cell) 抑制作用

脾臟은 크게 백비수와 적비수로 나누어지는데, 적비수는 대량의 적혈구를 포함하며, 백비수는 胚中心을 포함한 림프여포 (follicle)와 동맥주위 림프조직초 (periarterial lymphatic sheath)로 되어 있다. 림프여포의 주위를 여포주위대라고 부르는데, 이 속에는 림프구와 大食細胞가 가득차 있다. 따라서 炎症성 반응이 일어나면 T 세포와 B 세포 및 대식세포의 분화와 활동이 활발해져 脾臟의 무게가 늘어나게 된다⁴⁰⁾.

實驗결과 脾臟의 무게는 正常群이 94±9.00mg인데 비하여, 對照群이 145±32.00mg로 增加하였고, CRSST 投與群은 94±9.70mg로 對照群에 비하여 有意性있는 減少 (p<0.01)를 나타

내었다. 이는 CRSST이 T 세포와 B 세포 및 대식세포의 활동을 억제함을 보여주는 것으로, 염증자체의 억제 혹은 염증에 대한 과잉 면역의 억제로 인한 것으로 사료되며, 본 실험에는 RA를 유발시킨 후에 섭취시켰으므로 RA에서의 과잉면역을 억제한 것으로 생각할 수 있다.

형질세포 (plasma cell)는 항원에 반응한 B 세포로부터 생성되며, 그 중간 과정인 형질아세포 (plasma blast)는 2차 림프조직의 T 세포와 B 세포 상호작용이 일어나는 부위, 즉 림프절의 피질과 부피질사이의 가장자리와 비장의 림프구층에서 발달하여, 비장, 림프절의 수질 그리고 골수를 중심으로 전신에 분포한다. 형질세포는 1초에 300개까지의 면역 글로부린을 생성할 수 있으며, 주된 면역 글로부린은 IgG와 IgM이다. 또한 기억세포를 형성하며 이들은 주로 골수에 저장된다⁴²⁾.

실험 결과 IgG2b 생성량은 正常群이 2.5 ± 0.41 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 8.5 ± 1.57 (pg/ml)로 큰 폭으로 증가하였고, CRSST 投與群에는 3.8 ± 0.82 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性 있는 減少 ($p < 0.01$)를 나타내었으며 (Table 7, Fig 7), IgG3 생성량도 正常群이 1.4 ± 0.15 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 8.7 ± 1.25 (pg/ml)로 큰 폭으로 증가하였고, CRSST 投與群에서는 역시 4.3 ± 0.72 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性 있는 減少 ($p < 0.01$)를 나타내었다 (Table 8, Fig 8). 또한 IgM 생성량도 正常群이 1.7 ± 0.09 (pg/ml)인데 비하여, 對照群이 6.7 ± 1.03 (pg/ml)로 큰 폭으로 증가하였고, CRSST 投與群에서는 3.7 ± 0.9 (pg/ml)로 對照群에 비하여 有意性 있는 減少 ($p < 0.05$)를 나타내었다 (Table 9, Fig. 9). 면역 초기에 T 세포는 CD9, CD10 등을 가지고 있으나, 세포가 성숙하면서 CD4, CD3, CD8 등을 얻게 되며, 성숙된 흉선 세포는 두 개의 종류로 분리되는데, CD4⁺과 CD8⁺이다. 이 중에서 특히 CD4⁺는 T세포의 helper 세포에 의한 항원인식과 관련이 깊다. 또한 CD3⁺는 항원수용체 부위로 작용하고 있다. 반면에 CD8은 T 억제세포 혹은 세포독성세포에 의한 항원 인식과 관련이 깊다⁴³⁾.

慢性的인 염증현상이 지속되면 T림프구는 follicle의 형태를 취하게 되는데, 이들은 주로 CD4, CD45ge, CD29가 양성인 세포로서, 많이 분화되고 활성화된 memory세포들이다⁴²⁾. RA는 T세포, Macrophage, Synoviocytes 등이 활액막에 출현함이 특징이고, single-cell lining을 pannus라 부르는 충혈된 염증세포로 바꾼다. pannus안에서 염증, 증식, 체액성 및 세포성 면역반응이 연골과 결합조직을 파괴시키는 matrix metalloprotease enzyme 과 다른 mediator의 방출을 유도한다¹¹⁾. RA 환자의 활액막은 비후, 신생혈관의 증가, 염증세포의 침윤 등의 특징이 있다. 이중 특히 CD4⁺ T세포가 중요하다.

IL-17은 CD4⁺ activated memory T cells에 의해 분비되는 cytokines으로 인간 대식세포에 의해 IL-1 β 와 TNF- α 의 생산을 자극하고 연골파괴와 관련이 있다. 또한 활동성 NO와 catabolic enzyme를 포함하고, chondrocyte 증식과 proteoglycan의 합성을 감소시킨다. 또한 activate fibroblast와 synoviocytes에서 발견되고, IL-6, IL-8, PGE2, GM-CSF의 생산과 MMP-3와 MMP-13을 유도한다. 또한 IL-2도 CD4⁺ 세포에서 유래된다^{42b)}.

RA는 MHC class II HLA항원과의 연관성이 가장 크며, HLA class II의 주된 기능은 CD4⁺ T세포에 항원성 peptide를 나타내고, 활성화된 CD4⁺ T세포는 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 생산하고, 조직을 파괴하는 MMP를 분비하는데, IL-1, IL-6, TNF- α 는 RA에서 염증을 유도하는 중요한 cytokine이다^{10,36)}.

초기 cartilage와 bone의 파괴는 증식된 pannus의 형성과 관계가 있다. pannus와 cartilage 사이는 MMP와 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts 등이 차지한다. IL-1, TNF- α 는 endothelial cell의 부착분자를 자극하고, 관절안에 neutrophil을 증가시킨다. Neutrophil은 elastase와 protease를 방출하고, 관절의 superficial layer안의 proteoglycan을 쇠퇴시킨다. proteoglycan의 감소는 면역복합체를 collagen의 superficial layer에 재축하고 chondrocytes를 노출시킨다.

Chondrocytes와 synovial fibroblasts는 활성화된 CD4⁺ T세포, IL-1, TNF- α 에 의해 자극되면 조직을 파괴하는 MMP를 방출한다. MMP, 특히 stromelysin (MMP-3)과 collagenase (MMP-1)은 결합조직의 기질을 파괴시키고, RA에서 관절손상의 주된 매개체로 생각되는 enzyme이다. 또한 활성화된 CD4⁺ T세포는 osteoclastogenesis를 자극하여, IL-1, TNF- α 와 독립적으로 관절손상을 일으킨다¹⁷⁾. 단백질분해효소인 proteinase의 증가된 활동에 의해 관절 연골과 골의 ECM의 점진적인 쇠퇴는 RA에서 관절 파괴의 필수단계이다. proteinase중에서 matrix-degrading metalloproteinase는 관절 파괴에 중요한 역할을 하며, metalloproteinase는 MMP와 ADAM gene family로 구성된다²³⁾. MMP-1과 MMP-3은 RA에서 대부분의 결합조직의 쇠퇴를 일으키고, 이것의 생합성은 IL-1, TNF- α , PDGF 등에 의해 상승된다²⁹⁾. 실험결과, Joint 내의 CD4⁺/CD25 발현에 미치는 영향에서 면역세포 중 CD4⁺/CD25의 수는 각각 正常群에서 0.00 (%), 對照群에서 0.32 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.51 (%)로 측정되었으며 (Table 10, Fig. 10), 면역세포 중 CD3⁺/CD69⁺의 수는 각각 正常群에서 0.11 (%), 對照群에서 0.33 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.06 (%)로 측정되었다 (Table 11, Fig. 11). 또한 면역세포 중 CD4⁺와 CD8⁺의 수는 각각 正常群에서 0.26, 1.22 (%), 對照群에서 0.68, 2.58 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.37, 1.05 (%)로 측정되었고 (Table 12, Fig. 12), 면역세포 중 CD3e⁺와 B220⁺의 수는 각각 正常群에서 0.53, 71.4 (%), 對照群에서 1.52, 81.9 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.53, 74.8 (%)로 측정되었고 (Table 13, Fig. 13), 면역세포 중 CD4⁺와 CD25의 수는 각각 正常群에서 0.47, 1.66 (%), 對照群에서 1.05, 2.69 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 0.26, 1.43 (%)로 측정되었다 (Table 14, Fig. 14).

한편 Lymph node 내의 CD3e⁺와 B220 발현에 미치는 영향은 면역세포 중 CD3e⁺와 B220의 수는 각각 正常群에서 75.6, 20.9 (%), 對照群에서 52.1, 42.6 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 68.4, 29.1 (%)로 측정되었고 (Table 16, Fig. 15), Lymph node 내의 면역세포 중 CD3e⁺/CD69의 수는 正常群에서 4.99 (%), 對照群에서 6.41 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 4.66

(%)로 측정되었다 (Table 17, Fig. 17).

또한 Lymph node 내의 免疫細胞 中 $CD4^+$ / $CD25$ 의 數는 正常群에서 5.65 (%), 對照群에서 4.35 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 4.94 (%)로 측정되었으며 (Table 18, Fig. 18), Lymph node 내의 免疫細胞 中 $CD4^+$ 와 $CD25$ 의 數는 正常群에서 50.5, 20.2 (%), 對照群에서 28.4, 15.0 (%)로 나타난 반면, CRSST 投與群은 41.2, 18.3 (%)로 측정되었다 (Table 19, Fig. 19).

Joint 내에 염증반응이 일어나면 T cell의 항원 중 특히 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 의 비율이 높아지며, 주로 Lymph node를 거쳐서 Joint로 이동하여 RA 상태를 악화시키게 된다. 본 실험에서는 CRSST를 섭취한 實驗群에서 Lymph node보다 Joint 내의 T 세포 항원 중 특히 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 의 비율이 적게 나타난 것을 알 수 있었다. 이는 CIA mouse에서 RA가 발현될 때에 관절강 내에 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 의 발현을 중점적으로 억제해 주는 지표로 볼 수 있다. 또한 對照群에는 Lymph node에서 正常群에 비하여 낮은 비율로 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 가 관찰된 것을 알 수 있는데, 이는 Lymph node에서의 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 가 RA로 인해서 관절로 이동했음을 말해주며, 實驗群에서는 이 경우에도 對照群보다 높게 관찰되고 正常群과 수치가 유사한 것을 알 수 있었다. 이는 CRSST이 T cell의 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 를 억제함과 동시에 관절강내로 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 를 가진 T cell의 移動을 유발하는 RA의 形成을 억제하였음을 알게 해준다.

이상의 결과를 종합하면, 實驗群에서 對照群보다 RA에서 B cell로부터 생성되는 주된 免疫 글로부린인 IgG와 IgM의 형성을 억제하고, 또한 joint 내에 염증반응을 악화시키는 T cell의 항원 중 특히 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 의 비율을 낮추고, 과잉한 면역을 억제하여 脾臟의 무게도 正常群과 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 이는 CRSST이 RA에서 나타날 수 있는 過剩 免疫을 억제하거나 혹은 過剩 免疫을 일으킬 수 있는 RA의 形成을 抑制하는 것을 알 수 있다.

3. 組織學的 檢査

RA의 주요 病理的 徵候는 proinflammatory cytokine에 의해 자극받고 MMPs에 의해 관절에 염증이 발생하고 연골의 골 흡수가 형성되는 것이다. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 軟骨, 骨, 滑膜의 連接部의 寢食에 의해 발생한다. 이는 주로 IL-1, TNF- α 등의 염증 전구 cytokine에 반응한 대식세포나 섬유세포에 의해 생산되는 MMPs (주로 collagenase인 MMP-1, stromelysin인 MMP-3)에 의해 파괴된다¹⁰⁾.

본 실험에서, H-E 염색 결과 正常群의 관절 조직은 관절연골을 형성하는 연골세포는 기질과 함께 잘 보존되어 있고 주변에는 연골막과 윤활막들이 잘 보존되어 있었다. 對照群은 연골관절 가까이에서는 연골세포들의 뚜렷한 증식을 관찰 할 수 없었고, 반대로 연골하의 골관 부위에서는 연골세포에서 괴사소견과 함께 주변에서는 기질물질이 축적되었고, 염증세포의 출현과 섬유화를 동반하는 병변 소견들이 관찰되었다. 한편 實驗群은 正常群과 유사한 관절의 연골상태로 연골세포의 배열 및 기질의 축적 정도는 正常 상태를 보였고, 염증세포의 출현이나 섬유성 병

변도 實驗群에 비해 현저히 감소하였다 (Fig. 21).

교원섬유 (collagen fiber)의 축적 정도를 알아보기 위해 실시한 MT 염색결과 正常群에서는 연골부위에서 주로 관찰되었다. 연골을 형성하는 연골세포의 기질물질인 교원섬유가 주로 염색성을 보였다. 對照群에서는 연골의 기질뿐만 아니라 섬유성 병변이 관찰되는 연골하 골관부위나 윤활막 가까이에서도 교원섬유의 염색성이 강하게 관찰되었다. 實驗群에서는 正常群에 비해서는 연골하 골관부위나 윤활막 주변에서 다소 강한 염색성을 보였으나 實驗群과 비교해서는 전체적인 염색 발현 부위나 강도는 감소하였다 (Fig. 22).

일반적으로, 염증성 cytokines의 활성화도가 류마티스 활막염의 여러 양상인 滑膜組織炎, 滑膜液炎, 滑膜增殖, 軟骨과 骨의 손상 등과 RA에서의 전신 양상을 나타내는 원인으로 생각되고 있다. 이를 조직학적 소견과 연관지어 해석하면, CRSST이 IL-1, TNF- α 등의 염증성 cytokine 및 $CD4^+$ 를 중심으로 T 細胞의 형성을 저하시키고, MMPs의 형성을 방해한 결과, CIA mouse에서의 관절염의 유발 및 그 정도가 對照群에 비하여 實驗群에서 현저히 낮아진 것으로 볼 수 있다.

결론

CIA 모델에서 淸熱瀉濕湯加味方이 염증성 cytokine의 발현, 면역세포 활성화, 임파구 분포 변화 및 조직학적인 변화에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 淸熱瀉濕湯加味方은 mLFC에 대한 細胞毒性 평가에서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하 농도에서 毒性이 나타나지 않았다. 또한 6周 동안 對照群에 비하여 顯著的한 關節炎 發生率(AI)치의 減少 效果를 나타냈으며, 關節炎 發病率에서도 實驗群은 對照群에 비하여 4周부터 75 \pm 17.4%, 6周째에는 33.3 \pm 10.0%로 顯著히 減少를 나타냈다. 淸熱瀉濕湯加味方은 血清내에서 炎症抑制性 cytokine (IL-4, IL-10 등)의 發顯은 대조군에 비하여 有意性 있게 增加시키고, 炎症誘發性 cytokine (TNF- α , INF- γ 등)의 發顯은 有意性있게 減少시켰다. 淸熱瀉濕湯加味方은 脾臟의 무게 변화에 있어 對照群에 비하여 有意性있는 減少를 나타내었고, IgG2b, IgG3, IgM 생성량에 대하여 모두 對照群에 비하여 有意性있는 減少를 나타냈으며, Joint 내 $CD4^+$ 와 $CD3^+$ 의 比率를 낮춘 반면, Lymph node내에서는 對照群에 비해 높았으나 正常群과 큰 差異는 없었다. 조직학적 변화에서도 대조군에 비하여 연골 세포의 배열이 정상군에 근접하였으며, 염증 세포의 출현이나 섬유성 병변 등이 현저하게 감소하였다. 이상으로 보아 淸熱瀉濕湯加味方의 면역 조절작용을 통한 항관절염 억제 효과가 인정되며, 향후 다양한 약물의 가미를 통한 임상적 활용이 기대된다.

참고문헌

1. Aaron Barchowsky : Integration of the NF-B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the Collagenase-1 promoter: Divergence of IL-1 and

- TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts, *Cytokine*, 12(10):1469~1479, 2000.
2. Bradley, D. S., Nabozny, G. H., Cheng, S., Zhou, P., Griffiths, M. M., Luthra, H. S., David, C. S. : HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice: implications in human rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 100:2227-2234, 1997.
 3. Chang, M L, Yang, L L, Chang, D M, Kuo, S Y, Chu, S J. : The influence of Chinese traditional medicine on the production and activity of interleukin 1(IL-1), *Chinese Journal Of Microbiology And Immunology*, 26(1):15-24, 1993.
 4. Cristina Albanesi : IL-17 Is Produced by Nickel-Specific T Lymphocytes and Regulates ICAM-1 Expression and Chemokine Production in Human Keratinocytes: Synergistic or Antagonist Effects with IFN- γ and TNF- α , *J. Immunol.*, 162:494-502, 1999.
 5. Christiane Dresch, Ricardo Xavier, João C. Brenol, Nance B. Nardi and José A. B. Chies : Analysis of two T-cell receptor BV gene segment polymorphisms in caucasoid Brazilian patients with rheumatoid arthritis, *Immunology Letters*, uncorrected letters, 2003.
 6. Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A. and Mosedale, B., : Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283:666-668, 1980.
 7. Danielle M : The Effect of a T Cell-Specific NF- κ B Inhibitor on In Vitro Cytokine Production and Collagen-Induced Arthritis, *The Journal of Immunology*, 165:1652-1658, 2000.
 8. Day R.: Adverse reactions to TNF- α inhibitors in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 359(9306):540-541, 2002.
 9. Emery P. : Magnetic resonance imaging: opportunities for rheumatoid arthritis disease assessment and monitoring long-term treatment outcomes. *Arthritis Res*, 4:S6-S10, 2002.
 10. Guo, Chun; Piacentini, Lucia : Type I Collagen-induced MMP-2 Activation Coincides with Up-regulation of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase and TIMP-2 in Cardiac Fibroblasts, *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(47):46699-46708, 2003.
 11. Gordon Starkebaum, Nancy M. Shasteen, Robert M. Fleming-Jones, Thomas P. Loughran, Jr. and Mart Mannik : Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis Contain Antibodies to Recombinant Human T-Lymphotropic Virus Type I/II Envelope Glycoprotein p21, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 79(2):182-188, 1996.
 12. Judith Sylvester : *Tripterygium wilfordii* Hook F Extract Suppresses Proinflammatory Cytokine- Induced Expression of Matrix Metalloproteinase Genes in Articular Chondrocytes by Inhibiting Activating Protein-1 and Nuclear Factor-B Activities, *Mol Pharmacol*, 59:1196-1205, 2001.
 13. Karlfried R : NF- κ B Regulation by I κ B Kinase in Primary Fibroblast-Like Synoviocytes, *The Journal of Immunology*, 163:427-433, 1999.
 14. Kazuhito Asano, Jun Matsuishi, Ying Yu, Takako Kasahara and Tadashi Hisamitsu. Suppressive effects of *Tripterygium wilfordii* Hook f., a traditional Chinese medicine, on collagen arthritis in mice, *Immunopharmacology*, 39(2):117-126, 1998.
 15. Kelli P. A.: Resistance of Rheumatoid Synovial Dendritic Cells to the Immunosuppressive Effects of IL-10, *J. Immunol*, 163: 5599-5607, 1999.
 16. Luross and Williams, J.A. Luross and N.A. Williams : The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology*, 103:407-416, 2001.
 17. Marc Feldmann : Role of cytokines in Reumatoid Arthritis, London, *Annu. Rev. Immunol.* 14:398-399, 1996.
 18. Martine Chabaud : Enhancing Effect of IL-17 on IL-1-Induced IL-6 and Leukemia Inhibitory Factor Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes and Its Regulation by Th2 Cytokines, *J. Immunol*, 161:409-414, 1998.
 19. Magilavy, 1990. D.B. Magilavy, Animal models of chronic inflammatory arthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 259:38 - 45, 1990.
 20. Masaki Suzuki : The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α or IL-1 β -stimulated rheumatoid synovial fibroblasts, *FEBS Letters*, 465:23-27, 1999.
 21. Morita : Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium, *Rheumatology International*, 20(2):49-54, 2001.
 22. Nabozny, G. H.; Baisch, J. M.; Cheng, S.; Cosgrove, D.; Griffiths, M. M.; Luthra, H. S.; David, C. S. : HLA-DQ8 transgenic mice are highly susceptible to collagen-induced arthritis: a novel model for human polyarthritis. *J. Exp. Med.* 183:27-37, 1996.
 23. Okada Y, Gakuji Hashimoto, Takanori Aoki, Hiroyuki Nakamura, Kazuhiko Tanzawa : Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4), *FEBS Letters*, 494(3):192-195, 2001.
 24. Peter Charles : Regulation of Cytokine, Cytokine Inhibitor, and Acute-Phase Protein Following Anti-TNF- α Therapy in Rheumatoid Arthritis, *The Journal of Immunology*, 165:1203-9, 2000.

25. Peter C Taylor. Antibody therapy for rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Pharmacology*, 3(3):323-328, 2003.
26. Ramgolam, V; Ang, S G; Lai, Y H; Loh, C S; Yap, H K. Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agents, *Annals Of The Academy Of Medicine, Singapore*, 29(1):11-16, 2000.
27. Schaller, M., Burton, D. R., Ditzel, H. J. : Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nature Immun.* 2:746-753, 2001.
28. Shigeru Kotake : IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis, *J. Clin. Invest.* 103:1345-1352, 1999.
29. Shin Onodera : Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis , *J. Biol. Chem.*, 275: 444-450, 2000.
30. Shin. H. Y. , H. J. Jeong, H. J. Na, S. H. Hong, S. K. Lee, K. N. Lee, Y. S. Song, H. M. Kim and T. Y. Shin . : Daeganghwal -tang inhibits the stem cell factor-induced migration and inflammatory cytokines secretion in mast cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 85(1): 157-161, 2003.
31. Shunichi Shiozawa : Studies on the Contribution of c-fos/AP-1 to Arthritic Joint Destruction, *J. Clin. Invest.*, 99:1210-1216, 1997.
32. Simi T : Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways, *J. Immunol.*, 165:5227-5237, 2000.
33. Tao, X; Cush, J J; Garret, M; Lipsky, P E : A phase I study of ethyl acetate extract of the chinese antirheumatic herb *Tripterygium wilfordii hook F* in rheumatoid arthritis, *The Journal Of Rheumatology*, 28(10):2160-2167, 2001.
34. Trentham, 1982. D.E. Trentham, Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 25:911-916, 1982.
35. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4(5):281-9, 2002.
36. Zuoning Han : c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis, *Clin. Invest.* 108: 73~81, 2001.
37. 金榮其, 苔巖隨聞驗方錄, 醫聖堂, 서울, p.454, 2000.
38. 김영훈 : 류마티스樣 關節炎에 應用되는 防己의 效能에 관한 實驗的 研究, 慶熙大學校, 碩士學位論文, 1987.
39. 金定濟 : 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究所, pp.459-460, 1974.
39. 文希柱, 權赫儻 : 基本免疫學, 大學書林, pp.52-54, 113, 114, 1996.
40. 安景模 : 消痰逐水湯이 류마티드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
41. 楊泰勳 : 舒筋立案散이 류마티드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
42. 최승구 : 靑丘文化社, 必須臨床免疫學, pp.165-167, 193-195, 1998.
43. 崔容泰 外 : 精解鍼灸學, 서울, 杏林書院, p.184, pp. 165-174, 248, 279-282, 615-617, 1974.
44. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 麗江出版社, pp.1004-1010, 1994.