

원저

榆根皮 약침이 lipopolysaccharide 유발 류마티스 관절염 모델에서 MIF 활성화 억제에 미치는 영향

변혁 · 박인식 · 조현석 · 김갑성 · 이승덕

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effectiveness of Ulmus Davidiana Planch Herbal Acupuncture to Inhibit MIF Activation on Lipopolysaccharide-induced Rheumatoid Arthritis Model

Byun Hyuk, Park In-shik, Cho Hyun-seok, Kim Kap-sung and Lee Seung-deok

Department of Acupuncture & Moxibustion, Graduate School of Oriental Medicine,
Dongguk University

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effect of Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and mouse knee joints, performed several experimental items: those are MIF mRNA, MIF, TNF- α , NF- κ B p65, iNOS mRNA, iNOS, NO, synovial hyperplasia, angiogenesis and fibrosis.

Methods : In order to observe mRNA expression of MIF and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, RT-PCR was used. NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells was measured by nitrite assay. All the female BALB/c mice were bred and maintained in pathogen-free mouse colonies and were 6 weeks of age on beginning of the experiment. The experimental model of RA was induced by injection of 50 μ g/kg LPS. Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution was injected into either S 35 (犢鼻) or EX-LE 202 (內膝眼) of mice in turn daily for 19 days. Immunohistochemical staining was carried out to assess MIF, TNF- α , NF- κ B p65 and iNOS expression in synovial membrane. Synovial hyperplasia, angiogenesis and fibrosis in synovial membrane was observed with a microscope.

Results : 1. Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution inhibited mRNA expression of MIF and iNOS in dependence on a density of it in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

2. Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution decreased synovial hyperplasia, angiogenesis and fibrosis in LPS-stimulated mouse knee joints.

3. Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution curtailed production of MIF, TNF- α , NF- κ B p65, iNOS in LPS-stimulated mouse knee joints.

Conclusion : On the basis of these results, It was shown that Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution is significantly able to inhibit the production of MIF as a top in cytokines related to inflammatory or immune responses. Our results may provide that Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture solution has beneficial effect in not only RA but other inflammatory or immune deases.

Key words : Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture, Rheumatoid Arthritis (RA), Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), TNF- α , NF- κ B, iNOS and NO

I. 緒 論

류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis, RA)은 점진적인 활막 증식과 관절 파괴를 특징으로 하는 만성 질환으로, 한의학에서는 RA와 유사한 증상이 《金匱要略》에 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體尪羸, 脚腫如脫”이라고 최초로 기록되어진 것으로 미루어 볼 때 歷節風, 白虎病, 白虎歷節風, 類風濕性關節炎, 痺症의 범주에 속한다고 볼 수 있다¹⁾.

RA의 병인에 관한 연구들은 대부분 RA 관련 유전자, 면역 조절 기전의 이상 및 조직 손상을 야기하는 기전을 밝히는 것들인데, 이 중 cytokine이 RA에서 활막의 염증을 지속시키는데 중심적인 역할을 한다는 사실은 이미 많은 연구들을 통하여 잘 알려져 있다²⁾.

RA와 관련한 cytokine 중에서도 RA 조직의 배양에서 IL-1 β 의 발현은 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)에 의하여 조절됨이 밝혀졌고, TNF- α 중화항체를 이용하여 TNF- α 의 작용을 억제하는 경우 IL-1 β 의 발현 뿐만 아니라 Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor(GM-CSF), IL-6, IL-8 등 여러 염증성 cytokine의 발현도 억제되며, IL-1Ra를 이용하여 IL-1의 작용을 억제하는 경우에는 IL-6, IL-8의 발현은 억제되지만 TNF- α 의 생성에는 영향을 주지 않아 TNF- α 가 RA의 cytokine 네트워크에서 가장 상위에 있고 중심적인 역할을 하

는 것으로 생각되었다³⁾.

이에 따라 TNF- α 의 작용을 억제하는 TNF- α 에 대한 항체나 soluble receptor 등 (etanercept, infliximab, adalimumab)이 현재 임상에서 널리 사용되고 있으나 이들 약제들에 대한 반응은 개인에 따라 다양하다. 이처럼 항TNF- α 치료 약제들에 대해 효과에 있어 개인차가 있는 것은 RA에서 TNF- α 가 중요한 역할을 하지만 TNF- α 이외의 다양한 병태 생리적이전이 관여하고 있음을 시사한다⁴⁾.

대식 세포 유주 억제 인자(Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF)는 1960년대에 알려진 이래로 다양한 염증 반응에 연관이 되어 있음이 밝혀지면서 여러 질병들과의 관계에 대한 연구가 이루어지고 있다. 특히 RA나 다른 염증성 관절염의 병인 및 진행 과정에 관여하는 cytokine의 분비를 조절하는 상위 물질로 중요한 역할을 하는데⁵⁾, RA 환자의 혈청 및 활액 중에 MIF가 증가되어 있다는 사실은 이미 여러 연구를 통해서 알려져 있다⁶⁾.

현재까지 RA에 효과적인 치료 약물이 개발되지 않은 시점에서 최근까지 RA 발병과 관련된 cytokine에 대한 약침의 치료효과를 검증한 연구들로는 전갈 약침이 NF- κ B와 AP-1에⁷⁾, 인삼 약침이 IL-2, IL-4, IFN- γ 와 IL-10의 mRNA 발현에⁸⁾, 榆根皮 약침이 IL-1 β 와 TNF- α 에⁹⁾, 전갈 약침이 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 와 prostaglandin E2 (PGE2)에¹⁰⁾, 황기 약침이 IL-6에¹¹⁾ 미치는 영향에 관한 연구 등이 있었다. 그러나 아직 유근피 약침의 MIF 발현 억제를 통한 관절 염증을 억제 및 치료 효과에 관한 연구는

접하지 못하였다.

이에 저자는 *in vitro*에서 RAW 264.7 cell에 lipopolysaccharide(LPS)¹²⁾로 자가면역 염증 반응을 유발하고 利水, 通淋, 消腫하는 유근피를 약침액으로 제조, 처치한 후 MIF와 inducible Nitric Oxide Synthase(iNOS)의 mRNA 발현을 조사하고 NO의 변화량을 측정하였으며, *in vivo*에서 LPS로 mouse에 RA를 유발하고 인체의 犢鼻(ST35), 內膝眼(EX-LE 202)¹³⁾과 상응하는 곳에 유근피 약침을 시술한 후 윤행관절막의 일반적인 형태변화, 혈관분포 및 섬유화를 관찰하고, MIF, TNF- α , Nuclear Factor kappa B(NF- κ B) p65 및 iNOS의 변화량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 세포주와 세포 배양

Mouse의 macrophage인 RAW 264.7 cell은 Korean Cell Line Bank(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염 방지를 위한 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포가 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 Phosphate Buffer Saline(PBS)으로 씻고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL, USA) 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

2) 동물

태령 4주된 BALB/c계 암컷 mouse(대한 실험 동물 센터)를 무균 사육 장치 내에서 2주 동안 적응시킨 후, 체중이 20g된 것만 선별하여 사용하였다. 대조군, RA 유발군(RA군) 및 RA 유발 후 유근피 약침 처치군(UA군)으로 각각 분류하였으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

3) 약제

유근피 약침액은 GMP 기준에 따른 설비가 되어 있는 대한약침학회를 방문하여 다음과 같은 공정으로 제조하였다(Scheme 1).

4) 약침기

Hamilton syringe (Hewlett-Packard, USA)를 사용하였다.

2. 방법

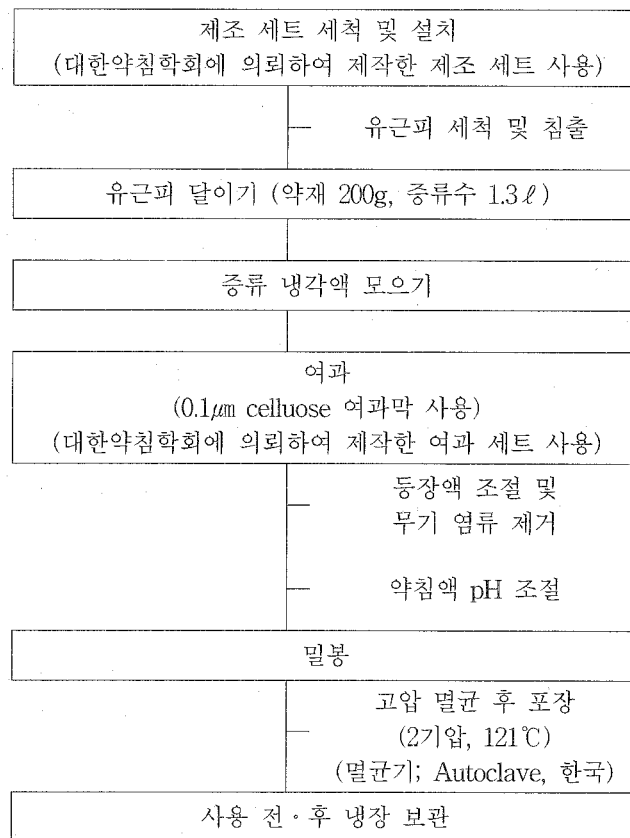
1) *In vitro*를 통한 유근피 약침액의 RA 관련 cytokine 유전자 발현

(1) 유근피 약침액의 RA 관련 cytokine 유전자 발현

유근피 약침액이 초기 RA 유발을 주도하는 cytokine인 MIF와 inflammatory cytokine인 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄 반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 cell - 5 \times 10⁵ cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후 LPS(Final 1 μ g/ml)를 2시간 처리하여 RA 관련 cytokine mRNA 발현을 유도하였다. 유근피 약침액을 10배, 100배 희석, 첨가하고 24시간 동안 배양한 다음, RNA를 trizol reagent (Sigma, USA)로 추출하고 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)로 cDNA를 합성하고, PCR machine으로 MIF와 iNOS primer를 반응시켰다. PCR 산물을 1-2% agarosegel 상에서 전기영동한 후 relative intensity를 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다(Table 1).

(2) Nitrite assay

Nitrite assay를 통하여 NO 생성량을 측정하였다. 2.1)가의 방법과 동일하게 배양하고, 자극 상층액을 모아 Greiss reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid) 50 μ l를 5분 간 실온에서 반응시킨 다음, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨(NaNO₂)을 사용하여 표준 용량 곡선을 작성하고, 대상시료 처리에 의한 macrophage의 질소 산화물(Nitric Oxide, NO₂⁻) 생성을 산출하였다.



Scheme 1. 유근피 약침액 제조 과정

Table 1. The Primer of MIF, iNOS and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product(bp)	No. of cycles
MIF	Sense	5'-CACCATGCCTATGTTCATCGTGAACA-3'	404	35
	Antisense	5'-GGGCTCAAGCGAAGGTGGAACCGTT-3'		
iNOS	Sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	Antisense	5'-AGAAGTGGAGGTACATGCTGGAGCC-3'		
β -actin	Sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	Antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

Abbreviation: MIF, Macrophage Migration Inhibitory Factor; iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase.

2) In vivo를 통한 유근피 약침의 RA 치료 효과

(1) RA 유발

RA 유발을 위해 LPS(Sigma, USA)를 증류수에 희석한 후 뒷다리 슬관절낭에 각각 300 μ g/kg씩 주사하였다. 슬관절낭으로의 정확한 주사를 위하여 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 다음, 무릎의

피부를 절개하여 무릎뼈를 확인한 후 주사하였다. 한편 슬관절에서의 RA 유발 여부는 LPS 주사 후 24-48 시간 동안 무릎 주변에 나타나는 부종 (edema) 의 확인을 통하여 이루어졌다.

(2) 유근피 약침 시술

RA 유발 제 3일부터 제 21일까지 총 19일 간 유근피 약침액 50 μ l/kg을 인체의 독비(ST35), 내슬안

(EX-LE 202)과 상응하는 mouse의 슬관절 부위에 하루씩(격일로) 번갈아가면서 반복적으로 시술하였다.

(3) 윤활관절 표본 제작

RA 유발 제 21일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고, vascular rinse와 10% Neutral Buffered Formalin(NBF)으로 심장 관류 고정을 실시하였다. 적출된 슬관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후, 통상적인 방법으로 paraffin 포매하여 5 μ m 두께로 연속 절편을 만들었다. 만들어진 연속 절편을 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본으로 제작하였다.

(4) 조직 화학

① 윤활관절막 내 혈관 분포 변화

윤활관절막의 자유면(apical surface) 기저부에서 모세혈관의 분포 변화를 조사하기 위해 심장 관류 고정 없이 적출하여 제작한 무릎 관절 표본을 Wright's stain solution에 30분 동안 반응시킨 후 관찰하였다.

② 윤활관절막 내 섬유화

윤활관절막 내 콜라겐 섬유화의 분포 변화 관찰은 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 통하여 이루어졌다. 우선 무릎 관절 표본을 Weigert's iron hematoxylin에서 20분간 핵 염색한 다음 Van Gieson's 염색 용액에서 5분간 collagen 섬유에 대한 염색을 실시하였다.

(5) 면역조직화학

초기 RA 유도 cytokine인 MIF, pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , inflammatory cytokine인 iNOS 및 전사인자인 NF- κ B p65의 윤활관절막 내 분포 변화를 조사하기 위하여 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 무릎 관절 표본을 proteinase K로 proteolysis한 다음 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역 반응을 억제하였다. 그 후 1차 항체(1:100, Santacruz, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 5일 동안 반응시키고, 2차 항체(1:100, Santacruz, USA)에 3일 동안 link 하였다. Avindin Biotin Complex(ABC) kit (DAKO)에 1

시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시키고, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 영상 분석과 통계 처리

Cytokine 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과를 수치화하기 위하여 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상 분석(image analysis)을 실시하였다. 영상 분석 결과는 통계소프트웨어 SPSS version 8.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 ANOVA test를 시행하여 $p < 0.05$ 이하인 경우 유의성을 인정하였다($\alpha < 0.05$).

III. 結 果

1. In vitro를 통한 유근피 약침액의 RA 관련 cytokine 유전자 발현

1) MIF mRNA 발현 억제

RAW 264.7 세포는 LPS 자극에 의해 MIF mRNA 발현이 증가하였는데, 유근피 약침액 처리군에서는 MIF mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 MIF mRNA 발현량에 비해 유근피 약침액 10^{-2} 농도 투여군에서는 57.2%, 10^{-1} 농도 투여군에서는 76.2%가 감소하였다 (Fig. 1).

2) iNOS mRNA 발현 억제

RAW 264.7 세포는 LPS 자극에 의해 iNOS mRNA 발현이 증가하였는데, 유근피 약침액 처리군에서는 iNOS mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 유근피 약침액 10^{-2} 농도 투여군에서는 20.1%, 10^{-1} 농도 투여군에서는 38%가 감소하였다 (Fig. 2).

3) NO 생성 억제

Nitrite assay 결과 RAW 264.7 세포를 LPS로 자

극하면 NO의 생성이 19 μ M에서 비해 198% 증가한 57 μ M로 측정되었다. 유근피 약침액 처리 시 농도 의존적으로 생성이 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발

현되는 NO 생성량에 비해 유근피 약침액 10^{-2} 농도 투여군에서는 2% 감소한 55 μ M, 10^{-1} 농도 투여군에서는 16% 감소한 48 μ M가 측정되었다(Fig. 3).

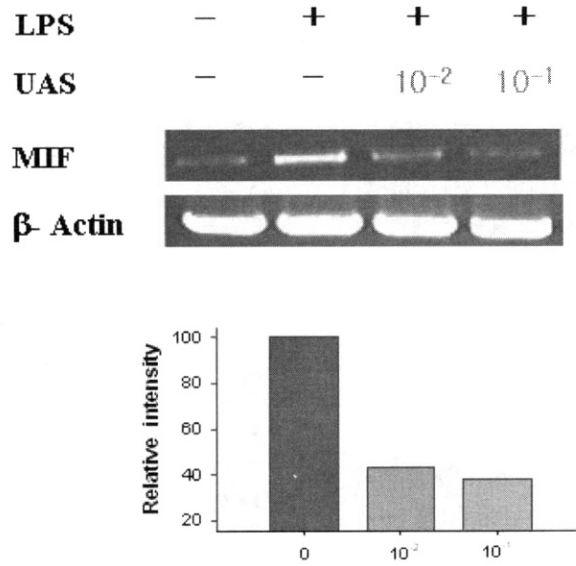


Fig. 1. Inhibition of LPS-induced MIF mRNA expression by UAS

The RAW 264.7 cells were treated with $1\mu\text{g/ml}$ of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (10^{-1} & 10^{-2}) of UAS and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced MIF mRNA expression were dose-dependantly decreased in UAS treated RAW 264.7 cells.

Abbreviation: LPS, Lipopolysaccharide; UAS, *Ulmus davidiana Planch* herbal Acupuncture Solution.

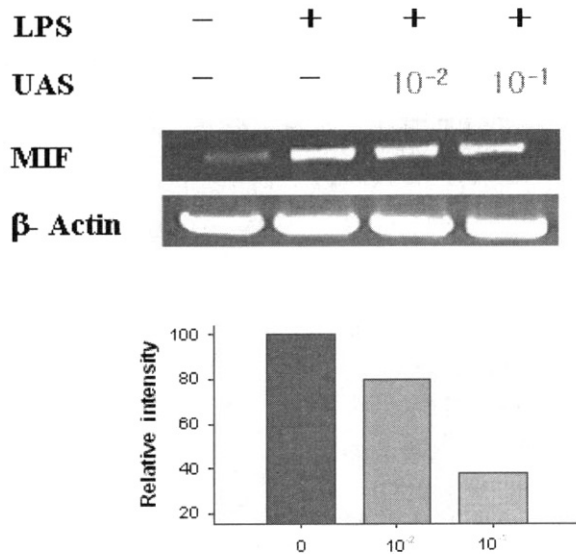


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced iNOS mRNA expression by UAS

The RAW 264.7 cells were treated with $1\mu\text{g/ml}$ of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (10^{-1} & 10^{-2}) of UAS and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS mRNA expression were dose-dependantly decreased in UAS treated RAW 264.7 cells.

Abbreviation: Same as Fig. 1.

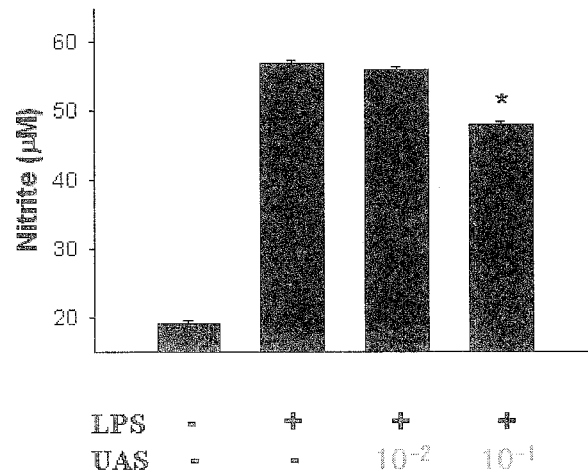


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced NO production by UAS in RAW 264.7 cells

The cells were treated with 1µg/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (10⁻¹ & 10⁻²) of UAS, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced NO production were dose-dependently decreased in UAS treated RAW 264.7 cell.

Abbreviation: Same as Fig. 1.; *, P < 0.05 compared with LPS alone.

2. In vivo를 통한 유근피 약침의 RA 치료 효과

1) 일반적인 형태 변화

RA 유발 후 윤활관절막의 자유면에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가, 많은 돌기(filopodia)를 가진 윤활세포의 출현 증가로 인한 거친 자유면 표면, 자유면 쪽으로 림프구의 침윤이다. 그러나 UA군은 RA군에서 나타난 형태 변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 RA군에 비해 UA군은 윤활관절막의 자유면 두께 증가가 적게 관찰되었다. 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소된 것으로 관찰되어, 자유면 표면이 매끄러운 상태로 나타났다. 또한 윤활관절막 자유면으로의 림프구 침윤 증가도 RA군에서 보다는 적게 관찰되었다(Fig. 4-A).

2) 윤활관절막 내 혈관 분포 감소

대조군의 윤활관절막 내 지방 조직 사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 RA 유발 후 증가되는 양상을 보였는데, 특히 윤활관절막의 자유면 기저부에서 직경이 큰 모세혈관 전세동맥(precapillary arteriole)과 모세혈관 후세정맥(postcapillary venule)의 출현이 증가하였다. 그러나 UA군에서는 윤활관절막의 일부 자유면에서만 모세혈관 출현 증가가 관찰되었

을 뿐, 그 외 지역에서는 대조군과 유사한 분포 양상을 나타내었다(Fig. 4-B).

3) 윤활관절막 내 섬유화 감소

RA 유발 후 섬유화(fibrosis)와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적이 증가하였다. 섬유화는 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 관찰되었다. 이런 섬유화 부위에서는 세포 가장자리가 잘 발달된 섬유모세포의 침적이 증가된 것으로 관찰되었다. 그러나 UA군의 윤활관절막에서는 RA군과 많은 차이를 보였는데, RA군에 비해 낮은 섬유화가 일어났다. RA군의 윤활관절막의 대부분의 지역에 확장되어 분포하는 콜라겐 섬유는 UA군에서는 윤활관절막의 자유면 기저부에서만 관찰되었는데, 지방층 사이의 모세혈관 주변부에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었다. 또한 섬유화 주변에 침적하는 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 4-C).

4) MIF 생성 억제

윤활관절막에 분포하는 MIF 양성 반응 세포는 윤활관절막 자유면에 분포하는 Fibroblast Like Synoviocyte(FLS)와 macrophage 두 가지로, 세포막에서 강한 MIF 양성 반응을 보였다. RA군에서는 대조군에 비해 568% 증가한 5300±327/100,000 pixel이 관찰되었다. UA군에서는 RA군에 비해 MIF 양

성 반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, RA군에 비
해 61% 감소한 2060±214/100,000 pixel이 관찰되었

다(Fig. 5).

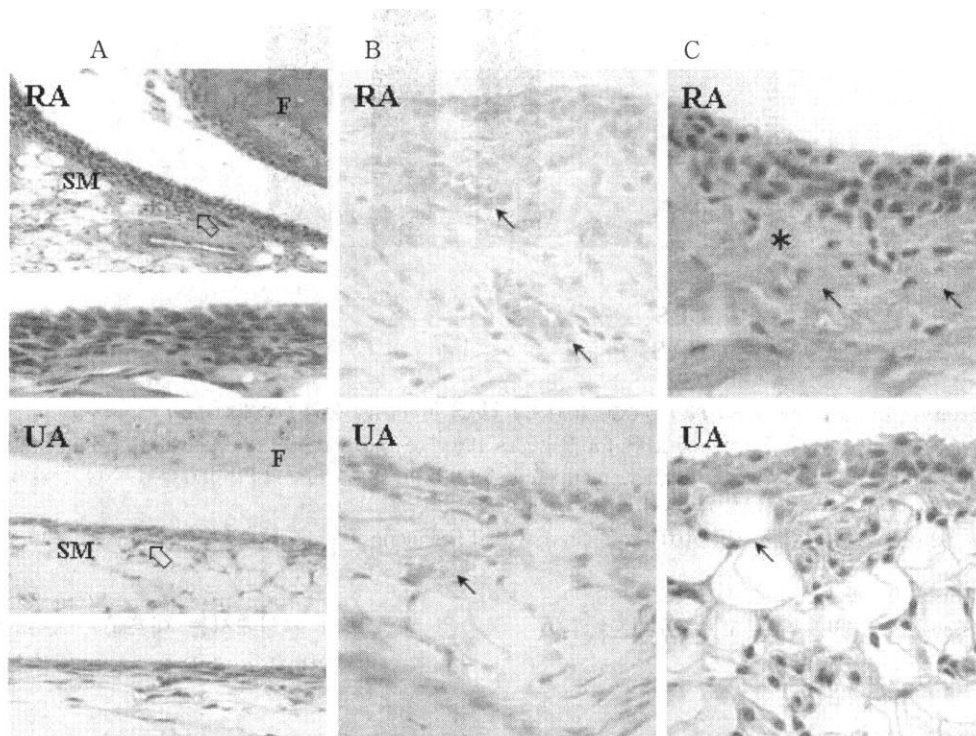


Fig. 4. Mitigation of RA-induced synovial damages by UAS

A. Inhibition of synovial hyperplasia (↔) (H&E; upper, ×200; lower, ×400).

B. Inhibition of angiogenesis (←) (wright' stain, ×400).

C. Inhibition of fibrosis (*, fibrosis; ←, collagen fiber) (Van Gieson's, ×400).

Abbreviation: UAS, *Ulmus davidiana Planch* herbal Acupuncture Solution; RA, Rheumatoid Arthritis elicited synovial membrane; UA, *Ulmus davidiana Planch* herbal Acupuncture treated synovial membrane after rheumatoid arthritis elicitation; F, Femur; SM, Synovial Membrane.

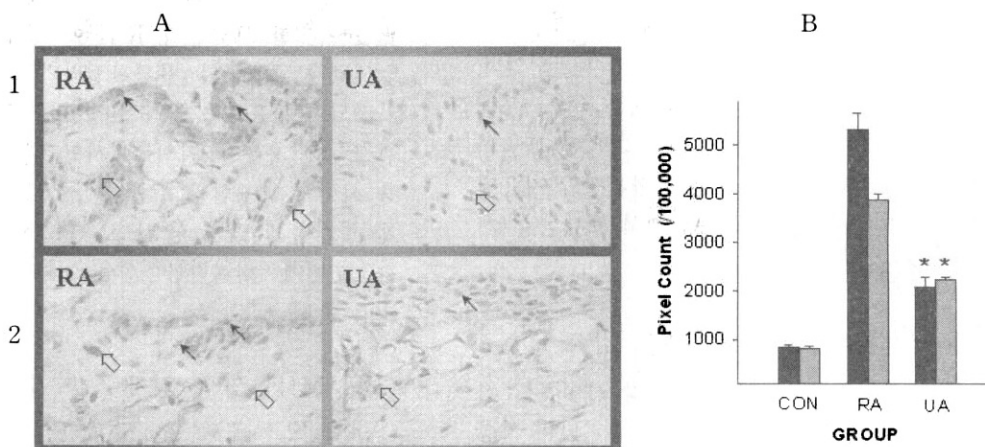


Fig. 5. Inhibition of RA-induced MIF & TNF- α activation by UAS

A. Immuno-reaction of (1) MIF & (2) TNF- α in synovial membrane (←, positive reacted fibroblast like synoviocyte; ↔, positive reacted macrophage; ×400).

B. Image Analysis for MIF () & TNF- α () positive reaction.

Abbreviation: Same as Fig. 4.; *, P < 0.05 compared with LPS alone.

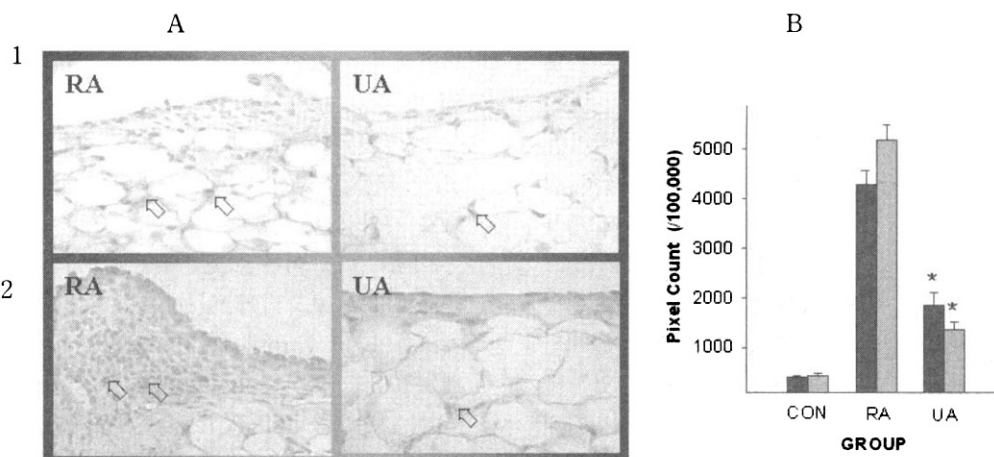


Fig. 6. Inhibition of RA-induced NF-κB p65 & iNOS activation by UAS
 A. Immuno-reaction of (1) NF-κB p65 & (2) iNOS in synovial membrane (←, positive reacted fibroblast like synoviocyte; ⇐, positive reacted macrophage; ×400).
 B. Image Analysis for NF-κB p65 () & iNOS () positive reaction.
 Abbreviation: Same as Fig. 4.; *, P < 0.05 compared with LPS alone.

5) TNF-α 생성 억제

윤활관절막에 분포하는 TNF-α 양성 반응 세포는 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage 두 가지로, 세포막에서 강한 TNF-α 양성 반응을 보였다. RA군에서는 대조군에 비해 376% 증가한 3870±110/100,000 pixel이 관찰되었다. UA군에서는 RA군에 비해 TNF-α 양성 반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, RA군에 비해 43% 감소한 2215±143/100,000 pixel이 관찰되었다(Fig. 5).

6) NF-κB 활성 억제

윤활관절막에 분포하는 NF-κB p65 양성 반응 세포는 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage 두 가지로, 핵막 주변부에서 강한 NF-κB p65 양성 반응을 보였다. RA군에서는 대조군에 비해 996% 증가한 4263±292/100,000 pixel이 관찰되었다. UA군에서는 RA군에 비해 NF-κB p65 양성 반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, RA군에 비해 57% 감소한 1846±258/100,000 pixel이 관찰되었다(Fig. 6).

7) iNOS 생성 억제

윤활관절막에 분포하는 iNOS 양성 반응 세포는 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage 두 가지로, 세포막에서 강한 iNOS 양성 반응을 보

였다. RA군에서는 대조군에 비해 1138% 증가한 5162±312/100,000 pixel이 관찰되었다. UA군에서는 RA군에 비해 iNOS 양성 반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, RA군에 비해 74% 감소한 1342±165/100,000 pixel이 관찰되었다(Fig. 6).

IV. 考 察

류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA)은 그 증상이 주로 가동 관절에 대칭적으로 나타나는 만성 전신성 염증 질환이며, 퇴행성 관절염과는 다르게 자가 면역성을 바탕으로 한다. RA 환자의 관절 조직에서는 염증 세포의 침윤, 활막염, 활막 증식에 의한 pannus의 형성 및 혈관 신생 등이 발생하며, 이런 상태가 만성적으로 지속되면 관절 연골과 뼈의 파괴가 시작되고 결국 관절 부전의 상태에까지 이르게 된다¹⁴⁾.

이러한 증상들과 관련하여 볼 때 RA는 한의학에서 痺症의 범주에 속하게 되는데¹⁵⁾, 《靈樞》에서 서술한 痺症 중 여러 관절들이 손상되고 상하 좌우로 이동하며 교체 발작하는 임상 증상과 성질에 근거하여 周痺 및 衆痺에 속하고, 病程이 길고 관절 腫痛이 오래도록 낫지 않는다는 점에서 頑痺에 속하며,

全身 大關節이 腫痛하고 晝輕夜重하며 그 통증이 극심하다는 점에서 歷節風, 白虎歷節風, 痛風 등과 유사하다.

이처럼 인류 역사와 오랫동안 함께한 질환이지만, 아직까지도 RA의 발병 기전에 대해서는 정확히 밝혀져 있지 않다. 지금까지 제시된 여러 가지 모델들은 크게 항원 특이적 기전과 항원 비특이적 기전으로 나눌 수 있다¹⁶⁾. 항원 특이적 기전의 경우, 원인이 되는 T 세포 항원이 아직 밝혀져 있지 않지만 바이러스나 세균에 의한 것으로 추측되고 있는데, shared epitope를 가진 RA 특이적 주조직 적합항원(class II Major Histocompatibility Complex)이 관절염 유발 peptide를 T 세포에 제공하여 T 세포를 활성화시키고, 활성화된 T 세포가 자가 항원과 교차 반응하여 macrophage를 자극함으로써 관절염이 시작된다는 것이다. 한편 항원 비특이적 기전의 경우, 관절염의 발생은 반복되는 감염, 조직 손상, 알레르기, 예방 접종 등과 같은 비특이적 자극에 의해 활막내 macrophage가 활성화 되고, 활성화된 macrophage로부터 생산된 TNF- α 나 GM-CSF 등의 cytokine들에 의해 수지상 세포의 분화가 유도되며, 분화된 수지상 세포가 강력한 항원 제시 세포로 작용하여 자가 항원을 자가 반응 T 세포에 전달함으로써 T 세포가 자극되어 관절염이 시작된다는 것이다. 두 기전에서 모두 관절염의 발생에 macrophage가 크게 관여하고 있는 것으로 여겨지고 있으며, 관절염이 유발된 후 활막에서 생산되는 cytokine들은 paracrine 또는 autocrine으로 작용하여 관절 염증의 악화와 만성적인 지속에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. RA의 발병 기전에서 cytokine의 역할은 1980년대 중반부터 많은 연구가 이루어졌다. 그 결과 TNF와 IL-1의 antagonist를 이용한 치료의 유효성이 RA에서 치료 대상으로서의 cytokine을 강조하는 근거를 마련하였다. 그러나 TNF와 IL-1의 antagonist를 이용한 치료에도 불구하고 반응이 없거나 반응이 불충분한 환자들이 있고, MIF와 길항 관계에 있는 glucocorticoid가 염증성 질환에서 “steroid-sparing” 효과를 보이고 있어¹⁸⁾ 보다 상위의 cytokine인 MIF에 대해 새로운 치료의 대상으로서 고찰해 볼 필요가 있다.

유근피는 느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 느릅나무(Ulmus davidiana Planchon var. japonica Nakai)의 코르크층을 벗긴 根皮를 건조한 것이다¹⁹⁾. 《本草綱目》, 《醫學入門》, 《鄉藥集成方》 및 《東醫

寶鑑》 등의 고전에 그 약성이 언급되어 있으며²⁰⁾, 민간에서는 淋疾, 水腫, 癰腫, 乳腺炎, 關節炎, 胃潰瘍 및 肝癌 등에 널리 사용되고 있다. 《醫學入門》에 따르면 유근피는 毒이 없고 水道를 通利하여 주고, 腫滿을 소멸시켜주고, 大小便을 소통시켜주는 것으로 나와 있다.

이와 같은 이론적 근거를 토대로 저자는 RA에 유효하다고 보고되어 있는 유근피^{9,21)}를 약침액으로 제조하여, in vitro에서 LPS 처리 macrophage에 10배, 100배 희석하여 투여한 후 MIF와 iNOS의 mRNA 발현을 RT-PCR로 조사하였고, in vivo에서 mouse 슬관절에 LPS 유발 관절염을 일으킨 후 通經活絡, 疏風散寒, 消腫止痛의 효능으로 슬관절염의 치료에 상용되는 穴位인 독비와 膝頭紅腫, 疥癩, 鶴膝風, 腿痛, 膝關節炎, 脚氣을 主治하는 穴位인 내슬안에 상응하는 곳에 유근피 약침을 刺入함으로써 윤활관절막에서 일어나는 일반적인 형태 변화, 혈관 신생, 섬유화를 관찰하고, 면역조직화학적 염색으로 MIF, TNF- α , NF- κ B p65 및 iNOS 변화량을, nitrite assay로 NO 변화량을 측정하였다.

연구에서 이용한 RAW 264.7 cell은 대식세포주로서 IL-1 또는 INF- γ 등과 같은 cytokine의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포 독성을 갖는 물질들의 독성 검정을 위해 유용하게 사용되고 있는 것이다²²⁾. RAW 264.7 cell의 활성화에는 실험실에서 흔히 사용하는 LPS를 이용하였는데, LPS는 동물에 각 종의 실험적 자가 면역병을 유발하는 물질로서¹²⁾, macrophage를 자극하여 IL-1 분비를 유발하여 T 임파구의 응답을 촉진시키고, 염증 반응 매개 물질인 TNF- α 의 분비를 유발시키며, PGE2의 생성도 증가시켜서 일과성의 급성 염증을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell은 MIF mRNA의 발현을 시발점으로 다양한 사멸인자들에 대해 apoptotic resistance를 가지게 된다²³⁾.

MIF는 최초의 T 세포 유래 cytokine으로, 정상적으로 혈액 내에 일정한 농도로 존재하며 추가적으로 시상하부 전엽과 다양한 외부 자극에 의한 반응으로 활성화된 단핵구 또는 macrophage에 의하여 분비된다. MIF는 macrophage의 무작위적인 이동을 억제하며, macrophage 및 림프구의 면역 기능을 조절하는 중요한 역할을 하고, glucocorticoid의 면역 억제 및 항염증 작용에 대해 역조절 기능도 갖는다. 면역 및 염증 질환, 예를 들어 RA, 패혈증, 지연형 과민

반응, 염증성 폐 질환, 악성 종양, 그리고 동맥 경화에 이르기까지 다양한 질환에서 다양한 기능을 수행하는 cytokine으로 알려져 있다²⁴⁾. 특히 류마티스 질환에서는 RA에서 MIF의 역할이 많이 연구되어 있다. RA 환자에서 MIF의 농도가 혈청, 활액, 활막의 섬유 세포에서 정상과 비교하여 증가되어 있으며, 질병의 활성도를 나타내는 C 반응 단백 수치와 양(+)의 상관 관계를 보이고, 치료 전과 후를 비교하였을 때 치료 후에 MIF가 감소하는 등 MIF가 RA의 임상적 발현 및 활성화에 중요한 역할을 한다²⁵⁾. Sampey 등은 RA 환자에서 MIF가 TNF, IL-1, IL-6, IL-8의 유리를 유도하며 phospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 상향 조절하여 PGE2의 생합성을 촉진함을 보고하였고, Onodera 등의 연구에서는 matrix metalloproteinase (MMP)의 합성을 증가시켜 관절의 파괴를 촉진한다고 하였다²⁶⁾. 또한 활막 세포의 증식 및 종양 억제 유전자 p53의 발현에 직접 영향을 미쳐 apoptosis 과정을 조절하기도 한다²⁷⁾.

이러한 MIF 발현에 대한 유근피 약침액의 영향 관찰로 LPS 자극 RAW 264.7 cell에 유근피 약침액을 10^{-2} , 10^{-1} 배로 희석하여 첨가한 결과, LPS 자극 시 발현되는 MIF mRNA 양에 비해 10^{-2} 배 희석액을 투여한 군에서는 57.2%, 10^{-1} 배 희석액을 투여한 군에서는 76.2%가 감소하여 유근피의 농도에 의존적으로 감소됨을 보였다.

MIF 생성 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해 in vivo에서는 mouse의 슬관절에 LPS를 처리한 후 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage의 세포막에서 나타나는 MIF 양성 반응을 관찰하였는데, RA군에서는 대조군에 비해 568% 증가한 $5300 \pm 327/100,000$ pixel이 관찰된 반면, 유근피를 약침 투여한 군에서는 RA군에 비해 61% 감소한 $2060 \pm 214/100,000$ pixel이 관찰되었다.

유근피 약침이 in vitro에서 보인 MIF mRNA 발현 억제와 in vivo에서 보인 MIF 양성 반응 감소는, 최근 MIF를 이용한 치료 방법으로서 항MIF 항체가 RA, 폐혈증 및 종양 발생의 억제에 효과가 있고, MIF 유전자 결핍인 동물 모델에서 관절염이 유의하게 억제 되었다는 보고들로 이들을 겨냥한 치료가 연구²⁸⁾되고 있는 시점에서 중요한 의의를 지닌다. MIF의 발현 억제는 TNF, IL-1, IL-6, IL-8 유리 억제, PLA2, COX-2 상향 조절 차단으로 인한 PGE2 생합성 억제, MMP 합성 억제, apoptosis 유도로 이

어져 RA 병인 기전의 최상위 단계를 차단할 수 있을 것으로 보여진다.

RA 윤활막과 혈청에서의 MIF 발현은 FLS와 macrophage에 의한 TNF- α 의 분비 증가를 일으키게 된다. RA 환자의 혈청과 활액에서 TNF- α 가 증가되어 있고, TNF- α 의 농도와 적혈구 침강속도 (Erythrocyte Sedimentation Rates, ESR) 및 활액의 백혈구 수가 비례함이 보고되었고, 다양한 실험적 방법을 이용하여 RA 환자의 활막 조직에서 TNF- α 의 mRNA와 단백질 발현이 증명되어²⁹⁾, TNF- α 는 RA의 병인 기전에 중요한 역할을 하는 cytokine으로 인식되었다. Human TNF- α 유전자 도입 쥐 (hTNFtg mice)에서 RA와 유사한 연골 및 뼈의 파괴를 보이고, 이 유전자 도입 쥐에 항TNF- α 항체인 infliximab을 투여한 경우 활막 염증의 감소 뿐 아니라 연골과 뼈의 파괴 및 활막조직 파괴 세포의 수에서도 현저한 감소를 보였으며³⁰⁾, RA 환자에 항TNF- α 항체를 투여한 경우 방사선 검사 상 관절 파괴의 진행이 억제됨을 보여³¹⁾ TNF- α 가 RA에서 뼈의 파괴에 중요한 역할을 함을 보여주었다. 또한 TNF- α 는 prostaglandin(PG)의 생성에 관여하는 secretory PLA2, COX-2나 microsomal PGE2 synthase의 발현을 증가시켜 PG의 생성을 촉진하고, 또 다른 염증 물질인 NO의 생성에 관여하는 효소인 iNOS의 발현을 촉진한다³²⁾. 그 외에도 TNF- α 는 활막 섬유아세포에 작용하여 세포 증식을 촉진하여 활막 과형성과 섬유화를 유도한다³³⁾. RA 환자의 말초혈액 단핵세포를 TNF- α 로 자극한 경우 Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)의 생성이 증가되고, RA 환자의 혈청 VEGF 수치가 증가되어 있으며, 항TNF- α 항체를 투여받은 RA 환자의 혈청 VEGF 수치가 감소함을 보여³⁴⁾ TNF- α 가 RA에서의 혈관 신생에 중요한 역할을 한다. TNF- α 는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF와 같은 다른 염증성 cytokine의 조절에도 관여하여 항TNF- α 항체를 RA 활막조직에 처리한 경우 염증성 cytokine의 생성이 감소함을 볼 수 있다³⁾.

이러한 TNF- α 에 대해 유근피 약침이 TNF- α 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 mouse의 슬관절에 LPS를 처리한 후 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage의 세포막에서 나타나는 TNF- α 양성 반응을 관찰한 결과, RA군에서는 대조군에 비해 376% 증가한 $3870 \pm 110/100,000$ pixel이 관찰된 반면, 유근피 약침을 투여한 군에서는 RA군

에 비해 43% 감소한 $2215 \pm 143/100,000$ pixel이 관찰되었다.

유근피 약침을 투여한 군에서의 이러한 TNF- α 생성 감소는 뼈의 파괴 억제, PG의 생성 억제, iNOS의 발현 억제, 활막의 과형성 억제, 섬유화 유도 억제 및 혈관의 신생 억제로 이어지고, 실제 mouse의 윤활관절 표본을 관찰한 결과 FLS의 과다형성, 섬유화, 혈관의 새로운 생성이 RA군에서 보다도 적게 관찰되었다.

실험에서 TNF- α , IL-1 β 등의 전염증성 cytokine들과 LPS는 NF- κ B의 활성화를 유도하게 되는데, mouse의 슬관절에 LPS를 처리한 후 유근피 약침을 투여하고 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage의 세포막에서 나타나는 NF- κ B p65 양성 반응을 관찰한 결과, RA군에서는 대조군에 비해 996% 증가한 $4263 \pm 292/100,000$ pixel이 관찰된 반면, 유근피 약침 투여군에서는 RA군에 비해 57% 감소한 $1846 \pm 258/100,000$ pixel이 관찰되었다.

이처럼 유근피 약침을 투여한 군에서 NF- κ B 활성이 억제된 것은 유근피 약침이 MIF 활성을 억제하여 TNF- α 의 분비 유도를 억제하였기 때문으로 판단된다. 분화된 macrophage의 NF- κ B 활성을 억제하게 되면 Bcl-2 family 중 하나인 A1의 급격한 감소로 mitochondria가 망가지고 caspase-9이 활성화 되어 macrophage에 apoptosis가 유발되고, 여러 면역 질환에서 이미 보고된 것처럼 활성화된 형태의 macrophage의 경우도 NF- κ B 활성을 억제하게 되면 apoptosis가 유발될 수 있어³⁵⁾ 관절염 환자의 관절 내에 국소적으로 NF- κ B를 억제함으로써 macrophage에 apoptosis를 유도할 수 있다. 실제로 관절염 환자의 관절에서 분리된 macrophage를 이용한 경우에도 NF- κ B를 억제함으로써 다른 사멸 인자 없이 macrophage의 apoptosis를 유도할 수 있음이 관찰되어 유근피 약침의 NF- κ B 활성 억제는 macrophage의 apoptosis를 유도하여 실제 관절염에 유용할 것으로 사료된다. 게다가 NF- κ B 억제가 macrophage의 apoptosis를 일으키기에 충분치 않더라도, 국소적으로 NF- κ B 활성을 억제하는 것은 iNOS의 작용을 차단하게 되어 NO로 인한 염증으로 유발되는 윤활관절막 내 조직 손상을 막음으로써 중요한 의미를 가질 수 있다³⁶⁾.

NO는 3개의 서로 상이한 합성효소 (Nitric Oxide Synthase, NOS)에 의하여 L-arginine에서 생산된다. 세 가지 NOS는, 주로 혈관내피세포에 존재하는 체

질성 관내피세포형(constitutive endothelial NOS, eNOS)과 주로 신경계에서 발견되는 체질성 신경형(constitutive neuronal NOS, nNOS), 그리고 유도형(inducible NOS, iNOS)인데, 이들 중에 iNOS는 macrophage에서 많은 양의 NO를 생산하도록 하는 작용을 하며, 또한 염증성 자극이 있을 경우에는 다른 세포에서도 상당량의 NO 생산을 유도하는 작용을 하고 있다³⁷⁾. NO는 free radical gas로 혈관내피세포의 이완에 관여하는 생리적 반응의 매개 물질로 1987년에 발표된 이래 여러 장기 및 조직에서 그 역할이 보고되고 있다. 혈관 긴장도, 혈소판 기능, 신경전달, 면역 반응 등의 조절에 중요한 역할을 하나, 생체 내 고농도의 NO는 숙주 세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관 확장, 염증 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있어 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. 최근에는 골세포 기능의 매개 물질로서의 NO 역할에 대한 관심이 증가되고 있다³⁸⁾. RA와 같은 염증성 질환에서는 국소적인 골소실이 특징적으로 발생하며, 이러한 임상 양상에서는 iNOS의 활성이 동반되고 있는데, 최근 van't Hof의 연구에 의하면 IL-1에 의해 유도된 과골세포에 의한 골 흡수에는 iNOS에 의한 NO 합성 경로가 관여한다고 보고되고 있다. 이러한 사실은 iNOS 경로를 통하여 형성된 NO가 cytokine에 의한 골 대사에 효과를 미치는 중개 인자로 활동하는 것으로 인식되고 있다³⁹⁾. 임상적으로도 RA에서 NO 형성이 증가됨이 보고되어⁴⁰⁾, RA에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 형성이 증가되고 IFN- γ 는 상대적으로 억제되는 것이 iNOS에 의한 NO의 형성을 소량만 증가시켜 골 흡수를 자극하는 방향으로 작용할 수 있는 점이 관절 주변의 골 소실을 설명하는 근거가 될 수 있다.

이처럼 염증 유발 및 골 대사와 관련있는 NO를 생산하는 iNOS 경로에 유근피 약침액이 미치는 영향을 살펴보기 위하여 LPS 자극 RAW 264.7 cell에 10^{-2} , 10^{-1} 으로 희석한 유근피 약침액을 첨가하여 iNOS mRNA의 발현을 관찰한 결과, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 량에 비해 10^{-2} 희석액 투여군에서는 20.1%, 10^{-1} 희석액 투여군에서는 38%가 감소하여 유근피의 농도에 의존적으로 감소됨을 볼 수 있었다.

In vitro에서의 iNOS mRNA 발현량 감소는 in vivo에서 iNOS 양성 반응 감소와 연결되었다. mouse의 슬관절에 LPS를 처리한 후 유근피 약침을

투여하고 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 macrophage의 세포막에서 나타나는 iNOS 양성 반응을 관찰한 결과, RA군에서는 대조군에 비해 1138% 증가한 5162±312/100,000 pixel이 관찰된 반면, 유근피 약침 투여군에서는 RA군에 비해 74% 감소한 1342±165/100,000 pixel이 관찰되었다.

In vitro에서의 iNOS mRNA 발현량 감소는 NO 생성 억제로 확인되었다. LPS 자극 RAW 264.7 cell에 유근피 약침액을 10⁻², 10⁻¹ 농도로 희석 첨가하여 nitrite assay한 결과, LPS 자극 시 생성된 NO량에 비해 10⁻² 농도 투여군에서는 2%, 10⁻¹ 농도 투여군에서는 16%가 감소하여 유근피의 농도에 의존적으로 감소됨을 보였다.

In vitro와 in vivo에서 보인 유근피 약침액의 iNOS 경로 차단을 통한 NO 생성 억제는 NO로 인한 염증 유발과 골 흡수를 차단하여 RA에서의 관절 변형을 막는데 기여하리라 기대된다.

이상의 결과로, 유근피 약침은 근본적으로 최상위의 cytokine인 MIF의 활성을 억제함으로써 TNF-α의 발현을 감소시켜 뼈의 파괴 억제, PG의 생성 억제, 활막의 과형성 억제, 섬유화 유도 억제, 혈관의 신생 억제를 유도하며, MIF 발현 억제를 통한 TNF-α 생성 억제가 NF-κB 발현 억제로 이어져 RA 발병 원인으로 대별되는 항원 특이적 기전과 항원 비특이적 기전 모두에 중요하게 관여하는 macrophage에서 apoptosis가 일어나도록 관여함으로써 RA의 진행을 막게 되고, NF-κB 발현 억제가 iNOS의 작용을 차단하게 됨으로써 NO 생성으로 인한 염증의 발생 뿐만 아니라 골 흡수로 인한 관절의 변형까지 막을 수 있을 것으로 기대된다. 이는 한의학에서 유근피의 消腫 작용과 연결되며, MIF와 길항 관계에 있는 glucocorticoid와 유사하다 볼 수 있으나 glucocorticoid의 작용이 비선택적으로 나타나고 그 부작용이 커서 장기간 치료에 사용될 수 없는 점을 감안할 때 부작용이 보고되지 않은 MIF antagonist로서의 유근피 약침은 더욱 더 큰 의의를 가진다고 볼 수 있다.

활성화된 형태의 macrophage가 RA, 퇴행성 질환, 패혈증, 조직 손상 등 수 많은 면역 질환에 관여한다는 것을 고려할 때, macrophage의 apoptosis를 인위적으로 조절하는 것으로 사료되는 유근피 약침은 RA 뿐만 아니라 여러 면역, 염증 질환에도 효과가 있을 것으로 추정되어 추후 연구에 대한 여지를 남겨둔다.

V. 結 論

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 면역 염증 반응에 유근피 약침액이 MIF와 iNOS의 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지와 LPS로 유도된 mouse 슬관절 RA에서 유근피 약침이 MIF, TNF-α, NF-κB p65, iNOS 및 NO의 생성과 윤활관절막의 형태 변화, 혈관 신생, 섬유화에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유근피 약침액은 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 cell에서의 면역 염증 반응에서 MIF와 iNOS의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.
2. 유근피 약침은 LPS에 의해 유도된 mouse 슬관절 RA에서 MIF, TNF-α, NF-κB p65 및 iNOS 양성 반응을 감소시켰다.
3. 유근피 약침은 LPS에 의해 유도된 mouse 슬관절 RA에서 윤활관절 세포의 증식, 혈관 신생, 섬유모세포의 증식, 섬유화를 감소시켰다.

이상의 실험 결과 LPS 유도 면역 염증 모델에 있어서 유근피가 MIF mRNA, TNF-α, NF-κB p65, iNOS mRNA 및 NO의 생성을 억제함으로써 강력한 항염증 효과를 나타내며, 이러한 항염증 효과는 RA를 비롯한 여러 면역 염증 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

VI. 參 考 文 獻

1. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수 등. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 177-96.
2. Miossec P. Cytokines in rheumatoid arthritis. Cell Mol Biol. 2001 ; 47 : 675-8.
3. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti

- TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 1995 ; 6 : 225-30.
4. 지종대. 류마티스 관절염에서 사이토카인의 발현과 역할. *Hanyang Medical Reviews.* 2005 ; 25(2) : 43-52.
 5. 김해립, 김상현, 김성동, 박미경, 박경수, 윤종현 등. 류마티스 관절염 환자의 활막 세포에서 MIF의 생성의 신호 전달 경로의 규명. *대한내과학회 추계학술대회.* 2003 ; 65 : 292.
 6. Onodera S, Tanji H, Suzuki K, Kaneda K, Mizue Y, Sagawa A, et al. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissue of rheumatoid joints. *Cytokine.* 1999 ; 11 : 163-7.
 7. Jae Yong Cho, Kyung Ho Kim, Hyun Seok Cho, Dae Jung Lim, Ji Hye Hwang, Kap Sung Kim. NF- κ B and AP-1-regulatory Mechanism of *Buthus Martensi* Karsch Herbal Acupuncture Solution on Inflammatory Cytokine-induced Human Chondrocytes Dysfunction. *The journal of Korean acupuncture & moxibustion society.* 2006 ; 23(2) : 61-72.
 8. Ki Rok Kwon, Byung Woo Kim. Comparative study of Various Ginseng Herbal Acupuncture - By measuring the increase of Life span of mice and Expression of cytokine mRNA. *The journal of Korean acupuncture & moxibustion society.* 2005 ; 22(2) : 203-10.
 9. Young Wook Jo, Jong Hwa Yoon, Kyung Ho Kim, Seung Deok Lee, Kap Sung Kim. Effect of *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture Solution on proinflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α production in collagen-induced arthritis of rats. *The journal of Korean acupuncture & moxibustion society.* 2005 ; 22(2) : 93-101.
 10. In Kwang Song, Woo Shik Choi, Joon Sung Park, Seung Deok Lee, Kap Sung Kim. The Effect of *Buthus martensi* Karsch Herbal acupuncture on Immune Responses to Adjuvant Induced Arthritis in Rats. *The journal of Korean acupuncture & moxibustion society.* 2002 ; 19(2) : 165-77.
 11. Jong Soo Kim, Sang Sup Sin, Cheul Ho Kim, Sun Dong Park, Won Hwan Park. Effect of Acupuncture and *Radix Astragali aqua* - acupuncture at Synsu (BL 23) on transcriptional expression of mouse cytokine IL-6. *The journal of Korean acupuncture & moxibustion society.* 1998 ; 15(2) : 147-55.
 12. 오찬호 역. *신면역학 입문.* 서울 : 지구문화사. 1995 : 118-23.
 13. 전국한외과대학 침구·경혈학교실 편저. *침구학(하).* 서울 : 집문당. 2001 : 381, 922.
 14. 윤지희. 실험동물모델을 통해 얻은 류마티스 관절염 발병기전에 대한 교훈. *Hanyang Medical Reviews.* 2005 ; 25(2) : 54.
 15. 정석희. *痺病의 문헌적 연구.* 대한한의학회지. 1995 ; 16(1) : 10.
 16. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 ; 45 : 101-6.
 17. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003 ; 423 : 356-61.
 18. Eric F. Morand, Richard Bucala, Michelle Leech. Macrophage Migration Inhibitory Factor : An Emerging Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 ; 48(2) : 291-9.
 19. 保健社會部 大韓藥典外 生藥規格集(韓藥). 1987 : 215.
 20. Choi JK. Long life with Korean herbal medicine. *Taeil Publications.* 1997 : 414-7.
 21. 황중순, 김경호. 유근피약침액이 Mouse 관절의 염증과 인지질 활성화에 미치는 영향. *동국대학교 석사학위논문.* 2004.
 22. 염정호. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 NO의 역할. *대한 산업의학회지.* 2001 ; 13(3) : 274-7.
 23. 김현식, 이명식. Macrophage 사멸의 신호전달 경로. *Korean Society at Medical Biochemistry and Molecular Biology.* 2006 : 25-34.
 24. Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichiyama H, et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA

- in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients : common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2004 ; 50 : 1437-47.
25. Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis : clinical correlations. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 ; 41 : 558-62.
 26. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinase in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 444-50.
 27. Ju Kyung Song, Hyun Young Shin, You Sun Lee, Jae Hee Hwang, Yang Sook Kwon, Yeon Ju Jeong, et al. Association between Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene Polymorphism and Rheumatoid Arthritis. *대한류마티스학회지*. 2005 ; 12(2) : 108-15.
 28. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor in murine antigen-induced arthritis : interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol.* 2001 ; 123 : 309-14.
 29. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991 ; 34 : 1125-32.
 30. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis : effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 2004 ; 50 : 277-90.
 31. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. N Eng J Med.* 2000 ; 343 : 1594-602.
 32. Grabowski PS, Macpherson H, Ralston SH. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. *Br J Rheumatol.* 1996 ; 35 : 207-12.
 33. Youn J, Kim HY, Park JH, et al. Regulation of TNFalpha-mediated hyperplasia through TNF receptors, TRAFs, and NF-kappaB in synoviocytes obtained from patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2002 ; 83 : 85-93.
 34. Paleolog EM, Young S, Stark AC, et al. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998 ; 41 : 1258-65.
 35. Park JM, et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis-CREB and NF-kB as key regulators. *Immunity.* 2005 ; 23 : 319-29.
 36. Georganas C, et al. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts : the dominant role for NF-kB but not C/EBPβ or c-Jun. *J. Immunol.* 2000 ; 165 : 7199-206.
 37. Nathan C, Xie Q-W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 13725-8.
 38. Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication : A role for nitric oxide. *J Cell Biochem.* 1995 ; 57 : 399-408.
 39. Hukkanen M, Hughes FJ, Lee D, BATTERY K, Gross SS, Evans TJ, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology.* 1995 ; 136 : 5445-53.
 40. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada

S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic

diseases. *Ann Rheum Dis.* 1992 ; 51 : 1219-22.