

원저

榆根皮 약침의 NF- κ B 활성화 억제능이 생쥐의 Type II Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

이아람* · 변혁* · 박인식* · 정찬영* · 강민주** · 김은정* · 이승덕* · 김갑성*

*동국대학교 한의과대학 침구학교실

**이성수한의원

Abstract

The Effectiveness of *Ulmus Davidiana* Planch Herbal Acupuncture to Inhibit NF- κ B Activation on Type II Collagen-induced Arthritis in Mice

Lee A-ram*, Byun Hyuk*, Park In-shik*, Jung Chan-yung*, Kang Min-joo**,
Kim Eun-jung*, Lee Seung-deok* and Kim Kap-sung*

*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Dongguk University

**Lee Sung Soo Oriental Medical Clinic

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effectiveness of *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture(UA) to inhibit nuclear factor(NF)- κ B activation on type II collagen-induced arthritis (CIA) in mice.

Methods : Using an *in vitro* test, the synoviocytes picked out from the experimental CIA mice were subcultured. The synoviocyte cells were treated with phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA) for 1 hour prior to the addition of indicated concentrations(0.4 - 1.0mg/ml) of UA, and the cells were further incubated for 24 hours. The *in vivo* tests, NF- κ B p65, inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1 production and apoptosis was observed by immunohistochemical staining.

Results : The PMA-induced I κ B kinase(IKK), iNOS and COX-2 mRNA expression were dose-dependently decreased in UA treated synoviocytes. Using the *in vivo* test, the number of eosinophils in mice treated with UA noticeably decreased in the the CIA group(P<0.05 using student t test). In mice treated

· 접수 : 2007년 10월 5일 · 수정 : 2007년 11월 14일 · 채택 : 2007년 11월 20일
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교 병원+한방병원 침구과
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

with UA, there was less cartilage erosion, less bone destruction, mild synovial hyperplasia, mild fibrosis, and mild angiogenesis with less MIP-2 production. By immunohistochemical staining, suppression of NF- κ B p65, iNOS production, inhibition of COX-2 production, inhibition of VCAM-1 production and inducing apoptosis were observed.

Conclusions : These results suggest that UA might be applicable to the therapy of RA to suppress NF- κ B activation.

Key words : type II collagen-induced arthritis; Rheumatoid arthritis; *Ulmus davidiana* Planch; herbal acupuncture

I. 서론

류마티스 관절염은 여러 기관을 침범하는 가장 흔한 만성적인 염증성 질환의 하나로 대표적인 자가 면역성 질환으로 생각되고 있다. 이는 다양한 전신증상이 나타나기도 하나, 대칭적으로 말초 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염이 특징적이다. 류마티스 관절염은 원인과 발생 기전 및 병태 생리가 아직 규명되지 않아 현재까지 근본적인 치료 방법이 없는 것으로 알려져 있다. 이러한 류마티스 관절염의 치료로서 서양의학에서는 약물요법, 적당한 휴식과 운동의 배합, 물리치료 등의 보존적 요법과 수술요법 등이 사용된다¹⁾.

한의학에서 류마티스 관절염은 문헌에 기록된 증상으로 미루어 볼 때 痺證, 歷節風, 痛風, 白虎歷節風, 鶴膝風, 風痺 및 類風濕性關節炎 등의 범주에 속한다고 볼 수 있으며, 그 중에서도 가장 포괄적이고 제한 운동, 감각장애를 총칭하는 痺證을 중심으로 痛風, 歷節風, 類風濕性關節炎 등과 연계하여 치료에 임하고 있다²⁻⁵⁾.

榆根皮(Root bark of *Ulmus davidiana* Planchon var. japonica Nakai)는 느릅나무의 코르크층을 벗긴 根皮를 건조한 것으로서 맛은 약간 달다⁶⁾. 《東醫寶鑑》 湯液篇에 榆皮는 “性平味甘無毒, 性滑利, 主大小便不通, 利水道, 除腸胃邪熱, 消浮腫, 利五淋, 治不眠, 療駒”라고 하였다. 榆根皮는 임상에서 이뇨, 각종 염증, 위궤양, 암 등의 치료에 사용되어 왔고 약리학적 작용으로 진통작용과 부종억제작용 그리고 백혈구 유주 억제 작용⁷⁾이 보고되어 있다. 최근에는 榆根皮의 관절염에 대한 치료 효과를 실험적으로 입증하려는 노력도

다양하게 이루어져 왔다. 강 등⁸⁾은 제2형 콜라겐으로 관절염을 유발한 쥐의 림프절 세포에서 interleukin(IL)-2, IL-6, interferon(IFN)- γ 의 감소를 보고하였고, 길 등⁹⁾은 제2형 콜라겐으로 관절염을 유발한 생쥐에서 IL-1 β , tumor necrosis factor(TNF)- α 의 억제와 IL-4, IL-10의 증가를 보고하였고, 조 등¹⁰⁾은 제2형 콜라겐으로 관절염을 유발한 쥐의 림프절 세포에서 IL-1 β 와 TNF- α 의 억제 효과를 보고하였고, 변 등¹¹⁾은 lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유발한 RAW 264.7 cell에서 macrophage migration inhibitory factor (MIF)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 mRNA 발현이 억제되고 LPS로 관절염을 유발한 생쥐에서 MIF, TNF- α , nuclear factor(NF)- κ B p65 및 iNOS 감소를 보고하였다.

이와 같은 보고를 토대로, 저자는 榆根皮의 관절염 치료가 염증 전단계의 면역학적 효과보다 항염증 효과에 의해 이루어진다고 가정하고, 생쥐에 type II collagen으로 관절염을 유발한 후 *In vitro* 실험에서 *In vivo* 실험에 사용한 생쥐의 무릎 윤활관절세포를 적출 및 배양하여 NF- κ B 활성 관련 cytokine인 I κ B kinase(IKK), iNOS, COX-2의 유전자발현 정도를 측정하고, *In vivo* 실험에서 인체의 陽陵泉(GB₃₄)^{12,13)}에 상응하는 슬관절 부위에 榆根皮 약침을 처치한 후 혈액 내 산호성백혈구의 변화를 관찰하였으며, 조직화학적 검사로 윤활관절막내의 형태학적 변화, 섬유화 및 섬유모세포의 변화, 혈관 분포 및 MIP-2의 변화를 관찰하였고, 면역조직화학 검사로 NF- κ B p65의 변화와 iNOS, COX-2, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 및 세포자기살해 변화(apoptosis)를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

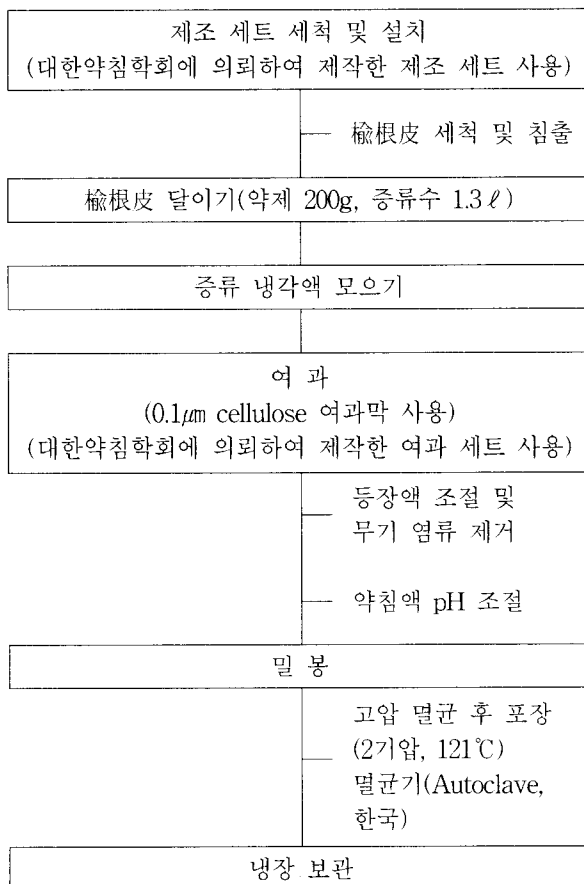
대령 4주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트, 한국)를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 약침액

榆根皮 약침액은 대한약침학회의 GMP 기준 시설하에서(Scheme 1)과 같이 제조하였다.

3) 약침기

1cc 일회용 주사기(SafeIne/경기의료공업, 한국)에 30gauze 1/2" 일회용 주사침(정림의료기산업(주), 한국)을 사용하였다.



Scheme 1. Making progress of *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture solution

2. 방법

1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 생쥐 무릎의 윤활관절세포는 관절염이 유발된 암컷 DBA 생쥐 무릎관절에서 추출하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 윤활관절주머니 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, USA)에 2시간 동안 반응하여 윤활관절막 분리하고 세절하였다. 0.1% collagenase에 37℃에서 1시간 동안 처리 한 다음 3000rpm에 5분간 원심분리하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS ; Sigma, USA)이 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크에서 80% 정도 자랐을 때 Phosphate Buffer saline (PBS)으로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3~5회 계대배양 세포를 사용하였다.

2) 윤활관절세포내 NF-κB 활성 관련 cytokine 유전자 발현

NF-κB 활성화에 관여하는 IκB kinase(IKK), 염증효소인 induce Nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase(COX)-2의 mRNA 발현 양상을 관찰하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 윤활관절세포 5×10^5 cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, Final 1ng/ml)를 1시간 처리하여 NF-κB 활성을 유도하였다. 榆根皮 추출액을 희석하여 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 수거하여 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK, iNOS, COX-2 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1). PCR 산물은 1~2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 통해 비교하였다.

Table 1. The Primer of IKK, COS-2, iNOS and β -actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product size(bp)	No. of cycles
IKK	sense	5'-CCACCCAGTTCCACAAGTCT-3'	380	35
	antisense	5'-CCTCCACTGCGAATAGCTTC-3'		
iNOS	sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense	5'-AGAAGTGAAGGTACATGCTGGAGCC-3'		
COX-2	sense	5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	35
	antisense	5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

Abbreviation : IKK, I κ B kinase ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; COX-2, cyclooxygenase-2 ; bp, base pairs.

3) Collagen Induced Arthritis(CIA) 생쥐에서 NF- κ B 활성 억제에 의한 항염증 효과

(1) 항원제조와 CIA 유발

CIA를 유발을 위해 우선 native bovine type II collagen(CII, Chondrex, USA)을 10mM acetic acid에 4mg/ml의 농도로 녹인 후 4°C에서 12시간 동안 교반하였다. CII와 4mg/ml의 complete Freund's adjuvant containing Mycobacterium tuberculosis strain H37RA (CFA, Chondrex)를 동량으로 섞은 후 균질기를 이용하여 1000rpm의 속도로 혼합하였다. CIA의 유발을 위한 1차 접종을 CII와 CFA 혼합액 50 μ l를 꼬리연결 근육부위에 피내주사를 통해 이루어졌으며, 1차 접종 2주 후에 CII와 CFA 혼합액 25 μ l를 발바닥에 추가 접종하여 CIA를 유발하였다. CIA 유발 후 1주일 간격으로 발의 두께 변화를 dial thickness cage(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

(2) 실험군 분류 및 유근피 약침 처치

무처치한 정상군(NOR군)과 대조군(CON군)으로 type II collagen 유발 관절염군 및 실험군(EXP군)으로 type II collagen 유발 관절염에 楡根皮 약침 처치군을 각각 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

CIA 유발 3일부터 28일까지 楡根皮 약침액 50 μ l을 인체의 陽陵泉(GB₃₄)에 상응하는 생쥐의 슬관절 부위에 매일 처치하였다.

(3) 혈액내 산호성백혈구 변화

염증성 질환의 대표적 지표인 산호성백혈구의 혈

액내 빈도 변화를 관찰하기 위해 우선 심장천자로 채혈한 후, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 Neubauer 계산반(Superior, Germany)으로 계수하였다.

(4) 윤활관절 표본 제작

CIA 유발 후 28일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(5) 윤활관절막 조직 손상 완화 효과 관찰을 위한 조직화학과 면역조직화학적 검사

① 윤활관절막내 섬유화

윤활관절막내 collagen 섬유화의 분포 변화 관찰은 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 통해 이루어졌다. 우선 무릎관절 표본은 Weigert's iron hematoxylin에서 20분 동안 핵 염색한 다음 Van Gieson's 염색용액에서 5분간 collagen 섬유에 대한 염색을 실시하였다.

② 윤활관절막내 혈관 분포

윤활관절막의 자유면 기저부에서 모세혈관의 분포 변화를 관찰하기 위해서 심장관류고정 없이 적출하여 제작된 무릎관절 표본을 Wright's stain solution에 30분간 반응 후 관찰하였다. 한편 혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 macrophage inflammatory

protein(MIP)-2 분포 변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse MIP-2(1 : 100, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1 : 20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse MMP-9(1 : 100, Santa Cruz Biotech)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG (DAKO)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex(DAKO)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(6) NF-κB 활성 억제와 항염증 효과 관찰을 위한 면역조직화학적 검사

① NF-κB 활성 변화

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor(NF)-κB의 분포 변화를 조사하기 위해 nuclear factor(NF)-κB p65(1 : 250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

② 염증효소 생성 변화

염증 효소인 iNOS-2와 COX-2의 조직 내 분포를 관찰하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1 : 250, Santa Cruz Biotech)와 rabbit anti-mouse COX-2(1 : 250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

③ 세포이주 변화

세포이주에 관여하는 세포부착분자인 Vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1의 조직 내 분포를 관찰하기 위해 rat anti-mouse VCAM-1(1 : 100, Santa Cruz Biotech)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

④ 세포자기살해 변화

NF-κB 활성 억제를 통한 apoptosis 유도 증가를 관찰하기 위해서 in situ apoptosis detection kit(Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL(terminal deoxy-nucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 pro-

teinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme(36μl TdT enzyme : 72μl reaction buffer)을 처리하여 37°C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigeninperoxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Hematoxylin으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

4) 영상분석과 통계처리

Cytokine 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma plot 2000을 통해 Student t-test로 p<0.05에서 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 율관절세포내 NF-κB 활성 관련 cytokine 유전자 발현 억제

1) IKK 유전자발현 억제

PMA 자극에 의한 율관절세포에서의 IKK mRNA 발현은 증가하였는데, 楡根皮 약침액 처리 후, 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA 자극 시 발현되는 IKK mRNA 발현량에 비해 10⁻³에서 7.5%, 10⁻²에서 10.7%, 10⁻¹에서 15.4% 감소하였다(Fig. 1).

2) iNOS 유전자발현 억제

PMA 자극에 의한 율관절세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 楡根皮 약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 10⁻³에서 5.1%, 10⁻²에서 25.9%, 10⁻¹에서 55.9% 감소하였다(Fig. 1).

3) COX-2 유전자발현 억제

PMA 자극에 의한 율관절세포에서의 COX-2mRNA 발현은 증가하였는데, 楡根皮 약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA 자극 시 발현되는 COX-2mRNA 발현량에 비해 10⁻³에서 6.1%, 10⁻²에서 23.5%, 10⁻¹에서 39.1% 감소하였다(Fig. 1).

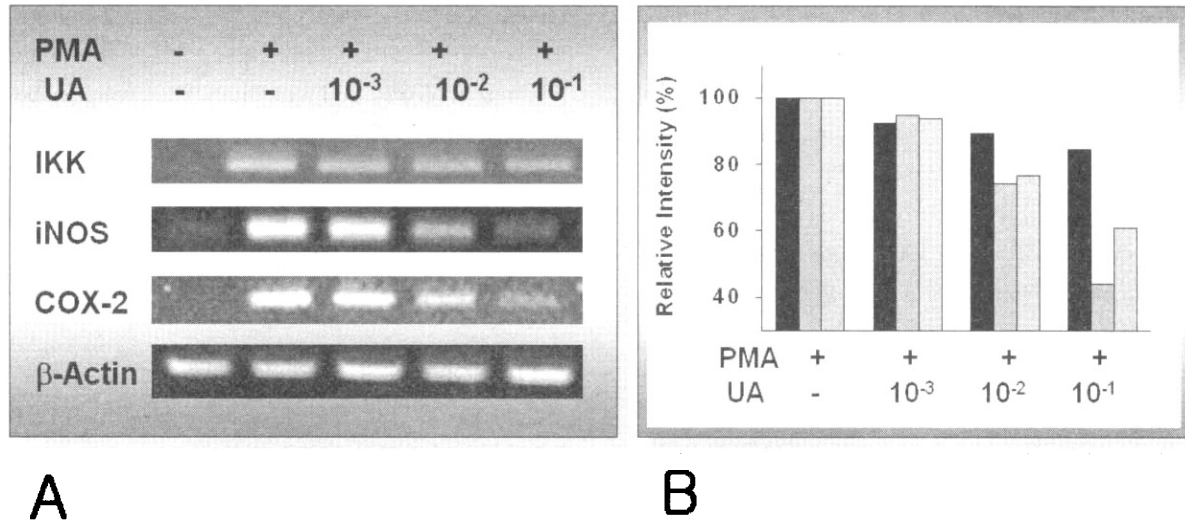


Fig. 1. Inhibition of NF-κB activation-entrained cytokine by UA *in vitro*

A. Inhibition of IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression. The synoviocyte cells were treated with PMA for 1 hours prior to the addition of indicated.

Concentrations(0.4, -1.0mg/ml) of UA, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression were dose-dependantly decreased in UA treated synoviocytes. B. Relative intensity for IKK (■), iNOS(▨) and COX-2(▩) mRNA expression.

Abbreviation. PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate ; UA, Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture ; IKK, IκB kinase ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; COX-2, cyclooxygenase-2.

2. CIA 생쥐 율관절막 손상 완화 효과

1) 혈액내 산호성백혈구 감소

정상군 1,141±128개/μl에 비해 대조군은 3,441±236 개/μl로 201.6%나 증가한 반면, 실험군은 1,900±132 개/μl로 대조군에 비해 55.2% 감소하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 보였다(Fig. 2).

2) 일반적인 형태 변화

CIA 유발 후 율관절막의 자유면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 율세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 율관절막 자유면의 두께 증가였다. 율강 쪽으로 많은 돌기(filopodia)를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 율세포의 출현도 증가하여 율관절막의 자유면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 자유면 쪽으로 침윤하는 림프구의 증가도 확인할 수 있었다. 그러나 실험군은 대조군에서 나타난 형태변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 대조군에 비해 실험군은 율관절막의 자유면 두께 증가가 적었다. 율강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 율세포들의 출현도 감소한 것으로 관찰되어, 대체적으로 정상군에서 관찰되는 율관절막

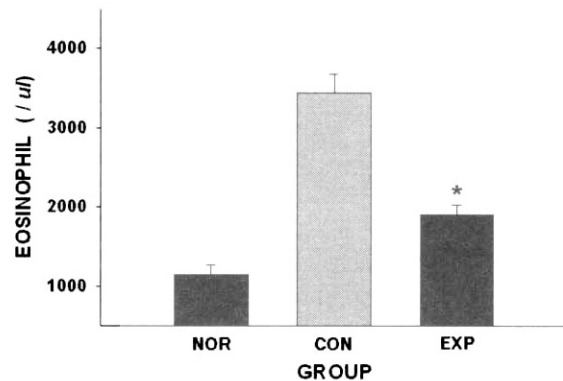


Fig. 2. Inhibition of eosinophil in UA treated mice after CIA elicitation

*, P<0.05 compared with CON group by Student t-test.

NOR, Non-treated group.

CON, collagen induced arthritis(CIA) group.

EXP, Ulmus davidiana Planch herbal acupuncture(UA) treated group after CIA elicitation.

과 같은 매끄러운 표면 상태로 나타났다. 또한 율관절막 자유면으로의 림프구 침윤 증가도 대조군보다는 적었다(Fig. 3-A).

3) 율관절막내 섬유화 감소

CIA 유발 후 율관절막내 주된 형태학적 변화 중

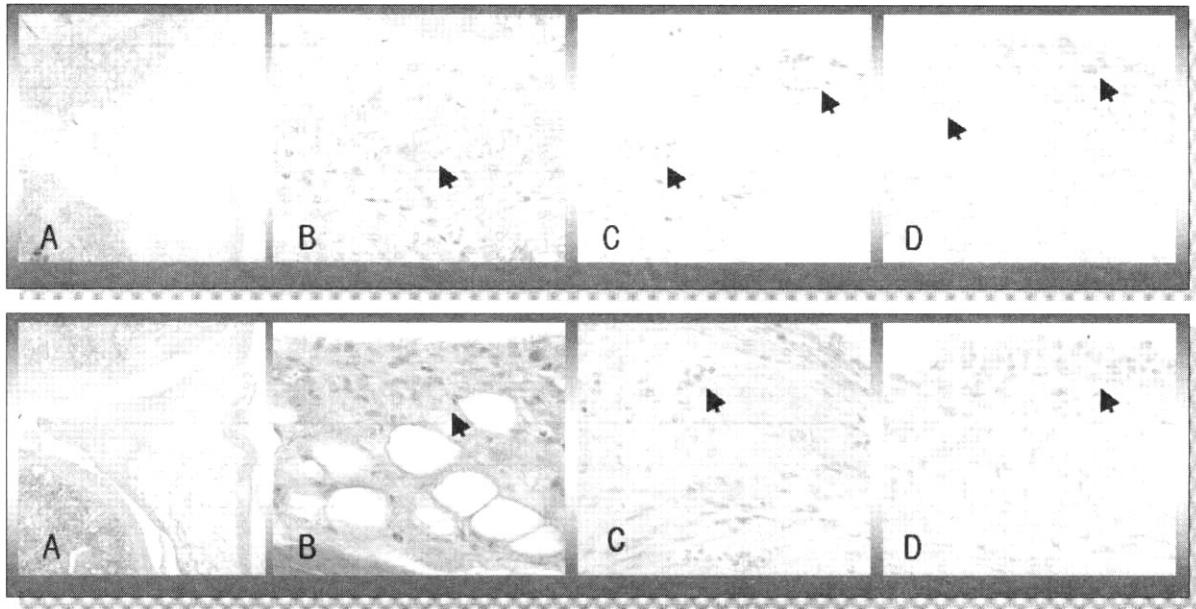


Fig. 3. Mitigation of type II collagen-induced synovial damages by UA

Upper photo, CON ; lower photo, EXP. A. Inhibition of CIA damaged synovial membrane(H&E, ×4). B. Inhibition of fibrosis(↖, collagen fiber ; Van Gieson's, ×400). C. Inhibition of angiogenesis(↖, capillary ; wright' stain, ×400). D. Inhibition of MIP-2(arrow) production(MIP-2 immunohistochemistry, ×1000).

Abbreviation. CON, collagen induced arthritis(CIA) group ; EXP, *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture(UA) treated group after CIA elicitation ; MIP-2, macrophage inflammatory protein-2.

또 하나는 섬유화와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적 증가였다. 섬유화의 양상은 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 섬유화가 관찰되었다. 이런 섬유화부위에서는 세포 가장자리가 잘 발달된 섬유모세포 침적이 증가된 것으로 관찰되었다. 그러나 실험군의 윤활관절막에서 관찰된 결과는 대조군과는 많은 차이를 보였는데, 우선 대조군에 비해 낮은 섬유화가 일어났다. 대조군의 윤활관절막 대부분 지역에 확장되어 분포하는 collagen 섬유는 실험군에서는 윤활관절막 자유면 기저부에서 관찰되었는데, 지방층사이의 모세혈관주변부에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었다. 또한 섬유화 주변에 침적하는 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 3-B).

4) 윤활관절막내 혈관 분포 감소

정상군의 윤활관절막내 지방조직 사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 CIA 유발 후 증가되는 양상을 보였는데, 특히 윤활관절막의 자유면 기저부의 윤활세포 주변에서 직경이 큰 모세혈관후세정맥(postcapillary venule) 출현이 증가하였다. 그러나 실험군에서는 일부 윤활관절막의 자유면에서만 모세혈관의 급속한 출현 증가가 관찰되었을 뿐, 그 외 지역에서는 정상군과

유사한 분포양상으로 나타났다(Fig. 3-C). 한편 혈관 신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 MIP-2의 양성반응세포의 분포도 대조군에서 증가한 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 MIP-2 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIP-2 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군 1,230±35 pixel에 비해 553.1% 증가한 반면, 실험군은 대조군 6,804±198 pixel에 비해 19.2% 감소하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 2, Fig. 3-D).

3. CIA 생쥐 윤활관절막내 NF-κB 활성 억제와 항염증 효과

1) NF-κB 활성 억제

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군 1,012±23pixel에 비해 523.8% 증가하였고, 실험군은 대

Table 2. The Image Analysis for Inhibition of Angiogenesis by UA

Objective	Group		
	NOR	CON	EXP
MIP-2	1230±35	6804±198	5500±124*

(image analysis for 200,000 pixels/range of intensity : 80-120).

M±S.D, Mean±standard deviation ; MIP-2, macrophage inflammatory protein-2 ; NOR, Non-treated group ; CON, collagen induced arthritis(CIA) group ; EXP, *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture(UA) treated group after CIA elicitation ; *, P<0.05 of Student t-test compared with CON.

Table 3. The Image Analysis for Suppression of NF-κB Activation by UA

Objective	Group		
	NOR	CON	EXP
NF-κB p65	1012±23	6293±189	4077±205*
iNOS	678±27	3188±157	1802±76*
COX-2	741±29	2515±114	1587±38*
VCAM-1	623±68	3685±48	1996±35*
Apoptosis	612±65	1640±58	3146±152*

(image analysis for 200,000 pixels/range of intensity : 80-120).

*, P<0.05 compared with CON group by Student t-test.

NOR, Non-treated group.

CON, collagen induced arthritis(CIA) group.

EXP, *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture(UA) treated group after CIA elicitation.

Abbreviation. NF-κB p65, nuclear factor(NF)-κB p65 ; iNOS, induce Nitric oxide synthase ; COX-2, cyclooxygenase-2 ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1. M±S.D, Mean±standard deviation.

조군 6293±189pixel에 비해 35.2% 감소하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4-A).

감소하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4-C).

2) 염증효소 생성 억제

염증 효소인 iNOS의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군 678±27pixel에 비해 370.2% 증가하였고, 실험군은 대조군 3188±157pixel에 비해 43.5% 감소하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4-B).

한편 염증 효소인 COX-2의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군 741±29pixel에 비해 239.4% 증가하였고, 실험군은 대조군 2515±114 pixel에 비해 36.9%

3) 세포이주 억제

세포이주에 관여하는 세포부착분자인 VCAM-1은 대조군에서는 증가하는 반면 정상군에서는 감소하였다. 이런 VCAM-1 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. VCAM-1 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군 623±68pixel에 비해 491.5% 증가하였고, 실험군은 대조군 3,685±48pixel에 비해 45.8% 감소하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4-D).

4) 세포자기살해 변화 관찰

Apoptosis는 대조군에서도 증가하지만 실험군에서는 더 큰 증가폭을 보였다. 이런 apoptosis는 주로 윤활관절막 자유면 부위에서 일어났으며, 핵에서 강한 양성반응을 보였다. Apoptosis의 영상분석 결과 대조군은 정상군 612±65pixel에 비해 167.9% 증가한 반면,

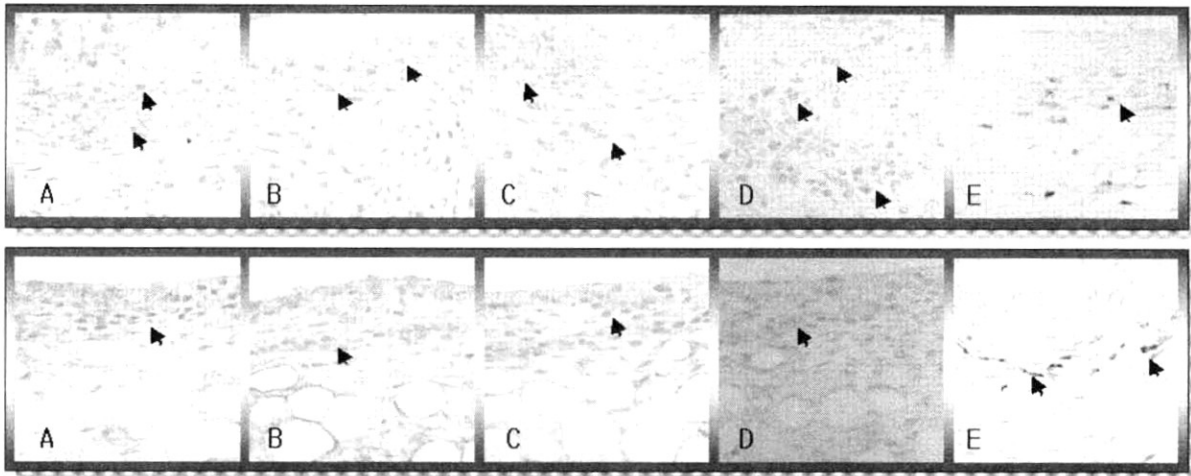


Fig. 4. Suppression of NF-κB activation by UA

Upper photo, CON ; lower photo, EXP.

A. Suppression of NF-κB p65(NF-κB p65(arrow) immunohistochemistry, ×1000). B. Inhibition of iNOS(arrow) production(iNOS immunohistochemistry, ×1000). C. Inhibition of COX-2(arrow) production(COX-2 immunohistochemistry, ×1000). D. Inhibition of VCAM-1(arrow) production(VCAM immunohistochemistry, ×1000). E. Inducing apoptosis(TUNEL method, ×400).

Abbreviation. NF-κB p65, nuclear factor-κB p65 ; iNOS, induce Nitric oxide synthase ; COX-2, cyclooxygenase-2 ; VCAM, vascular cell adhesion molecule ; CON, collagen induced arthritis(CIA) group ; EXP, *Ulmus davidiana* Planch herbal acupuncture(UA) treated group after CIA elicitation.

실험군은 대조군 1,640±58pixel에 비해 91.8% 더 증가하여 유의성(P<0.05) 있는 증가를 보였다(Table 3, Fig. 4-E).

IV. 고 찰

류마티스 관절염은 전신적인 만성 염증성 질환으로 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증이 야기되어, pannus에 의한 뼈의 파괴, 윤활관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백분해효소, O₂ radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 일어난다. 이러한 류마티스 관절염이 심한 경우 류마티스 결절, 백관염, 안염증, 신경기능이상, 심폐기능장애, 림프절병증, 비장종대 등의 관절 외 류마티스 증상이 발현된다¹⁴⁾. 한편 류마티스 관절염은 주로 30~40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병율을 보이고 있지만 보통 평균 유병율은 0.8%로 추정되며¹⁵⁾, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다.

류마티스 관절염의 발병 원인에도 불확실한데 반해, 류마티스 관절염 발병 시 관절강 내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다.

요약해 보면, 윤활액내의 type II collagen 역가 증가¹⁶⁾, MIF의 증가¹⁷⁾, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF-α의 증가^{18,19)}, 염증성 전사인자인 NF-κB의 활성화와 염증효소 COX-2와 iNOS의 증가^{20,21)}, 단백분해효소(matrix metalloproteinase ; MMP)의 증가²²⁾ 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류마티스 관절염은 발병 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질 호르몬, 질환 변형 약제, 항TNF-α제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다. 각각은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 류마티스 관절염은 痺證의 범주에 속한다고 볼 수 있으며, 문헌적으로 고찰하면 최초로 《黃帝內經 : 素問》 痺論에서 風寒濕에 의하여 발생하며, 行痺, 痛痺, 着痺, 肝心脾肺腎의 五臟痺, 筋脈肌皮骨의 五痺에 대해 언급하고 있고, 漢代 張仲景은 《傷寒論》 太陽病脈證并治篇과 《金匱要略》 痲濕喝病脈證

并治篇, 中風歷節病脈證并治篇에서 太陽風濕, 濕痺, 歷節病을 언급하며 그 증상으로 “歷節痛 不可屈伸”, “其痛如掣”, “諸肢節疼痛 身體魁羸 脚腫如脫”하다고 기술하고 증상에 따라 처방을 달리 하였다. 隋代 巢元方은 《諸病源候論》에서 痺證을 風濕痺, 風痺, 風不仁, 風冷, 風四肢拘攣不得屈伸 등의 증후로 나누어 파악하였다.

榆根皮는 《神農本草經》上品에 榆皮라는 이름으로 “味甘平 主大小便不通 利水道 除邪氣 久服 輕身不飢 其實尤良 一名零榆”라 처음 기재되었고, 《本草綱目》에서는 “榆皮는 滑利하고 下降하는 성질이 있어 小便不通, 五淋腫滿, 喘嗽不眠, 經脈胎產 등의 諸症을 다스릴 수 있다”고 하였다. 이상의 효능을 근거로 최근에는 榆根皮의 항암 효과²³⁾, 항산화 효과²⁴⁾, 항균 효과²⁵⁾, 항염증 효과²⁶⁾ 등에 대한 연구와 관절염의 치료 효과에 대한 연구²⁰⁻²³⁾가 다양하게 진행되고 있다.

RA 유발 시 윤활관절막의 두께 비후는 자유면에 위치한 윤활분비세포 또는 섬유모세포유사윤활세포(fibroblast like synoviocyte ; FLS)의 세포과형성으로 기인된 것으로 MIF 활성화에 의한 세포분열의 촉진과 세포자기살해 억제에 의한 결과이다. MIF는 in vitro와 in vivo 실험을 통해 류마티스 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다¹⁷⁾. FLS의 증가는 IL-1 β , IL-2, cell adhesion molecular(CAM)의 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생성 증가, 섬유화 및 염증부위의 이주세포의 증가를 유도한다²⁷⁾. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1 β 신호기전에 의한 것으로 collagen 섬유 합성 촉진과 collagenase의 합성 또한 유도하고²⁸⁾, 관절염 유발 시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용²⁹⁾, 관절 내 연골과 연골 하 골조직의 파괴³⁰⁾ 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다³¹⁾.

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에 의한 TNF- α 의 분비 증가를 일으키며, 그 결과 염증관련 전사인자인 NF- κ B의 활성을 유도한다. 1986년 B cell에서 immunoglobulin κ light chain에 결합하는 인자로서 발견된 전사인자 NF- κ B는 p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성되며, 보통 상태에서는 세포질에서 그 inhibitor인 I κ B protein(I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl3)들과 결합하고 있어 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokine(TNF- α , IL-1), bac-

terial/viral infection(LPS, dsRNA), stress(ROI, UV, adriamycin, 방사선) 등의 다양한 자극에 의해 I κ B protein이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site (consensus sequence : 5'-GGGpNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다³²⁾. I κ B protein의 인산화는 I κ B kinase로 알려진 IKK(IKK α , β)에 의해서 일어나게 되는데 IKK의 활성화는 다양한 자극에 의해 유도되어 I κ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로서 인산화된 I κ B protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해된다(degradation). 전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 염증효소 iNOS COX-2 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도한다³³⁾. 유도성 동종효소 (inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다³⁴⁾.

iNOS는 reactive oxygen species(ROS)의 일종인 산화질소(NO)를 생성하는데, 산화질소는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxy-nitrite나 hydroxyl radical이 형성되고³⁵⁾, 이는 세포막 지질을 peroxidation 시키며, thiorl, SH기를 oxidation 하여 세포독성을 유발한다³⁶⁾. 또한 단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포 대사에 중요한 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성 효과가 있다³⁷⁾.

본 연구에서 생쥐에 type II collagen으로 관절염을 유발한 후 *In vitro* 실험에서 *In vivo* 실험에 사용된 동일한 생쥐의 무릎 윤활관절세포를 적출 및 배양하여 NF- κ B 활성화 관련 cytokine인 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA발현량을 측정하여 榆根皮 약침액을 처

리하지 않은 율관절세포에 비해 楡根皮 약침액을 처리한 율관절세포에서 IKK mRNA는 10^3 에서 7.5%, 10^2 에서 10.7%, 10^1 에서 15.4%로 감소하였고, iNOS mRNA는 10^3 에서 5.1%, 10^2 에서 25.9%, 10^1 에서 55.9%가 감소하였으며, COX-2 mRNA는 10^3 에서 6.1%, 10^2 에서 23.5%, 10^1 에서 39.1%로 감소하여 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현량 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 이는 楡根皮 약침액이 율관절세포에서 NF- κ B 활성을 억제하고 그로 인해 염증 효소의 생성을 억제하는 것으로 사료된다. *In vivo* 실험에서 type II collagen 유발 생쥐의 관절염을 대상으로 筋會이며 슬관절의 근위부에 있고 문헌적으로 痺證에 사용빈도가 가장 많은 陽陵泉(GB₃₄)에 상응하는 부위에 楡根皮 약침을 주입한 후, 혈액내 산호성백혈구(eosinophil)의 수를 조사한 결과 실험군이 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소되어 염증이 완화된 것을 확인하였고, 조직화학 실험으로 율관절막내의 형태학적 변화에서 대조군에 비해 실험군은 율관절막의 자유면 두께 증가가 적고, 율관 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 율세포들의 출현도 감소한 것으로 관찰되며, 림프구 침윤도 적었다. 류마티스 관절염의 특징인 섬유화 또한 대조군에 비해 감소하였고 섬유화 주변에 침착하는 섬유모세포의 수도 적었다. 대조군의 율관절막내 지방조직 사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 대조군에서 증가되었는데 특히 율관절막의 자유면 기저부의 율세포주변에서 모세혈관후세정맥의 출현이 증가하였으나 실험군은 일부 율관절막의 자유면에서만 모세혈관의 출현 증가가 관찰되었을 뿐이었고, 혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 MIP-2의 양성반응세포의 분포를 측정 후 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 453.1% 증가되었으나 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다. 면역조직화학 실험으로 NF- κ B p65의 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 523.8% 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다. NF- κ B의 활성화에 의해 증가되는 염증효소인 iNOS와 COX-2를 실험 결과 iNOS 양성반응은 대조군이 정상군에 비해 370.2% 증가하였고 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였으며, COX-2 양성반응은 대조군이 정상군에 비해 239.4% 증가하였고 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다. NF- κ B의 활성화에 의해 증가되는 세포이주에 관여하는 세포부착분자인 VCAM-1 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 491.5% 증가하였고 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다.

실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다. NF- κ B의 활성화에 의해 억제되는 세포자기살해의 변화를 관찰한 결과 대조군은 정상군에 비해 167.9% 증가한 반면 실험군은 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다.

이상의 실험 결과에서 楡根皮 약침이 type II collagen 유발 생쥐의 관절염 치료에서 NF- κ B의 활성 억제를 통해 율관절세포의 IKK, iNOS, COX-2의 유전자 발현을 농도 의존적으로 감소시키고 함께 혈액학적, 조직학적인 염증 완화뿐만 아니라 NF- κ B의 감소, 염증효소의 감소, 세포이주의 억제 및 세포자기살해 유도를 통해 류마티스 관절염으로 기인된 손상의 회복에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

楡根皮 약침의 류마티스 관절염에 대한 치료 효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 楡根皮 약침액의 NF- κ B 활성 관련 Cytokine의 유전자 발현을 조사하였고, CIA 모델 생쥐를 대상으로 인체의 陽陵泉(GB₃₄)에 상응하는 슬관절 부위에 楡根皮 약침을 처치한 후 혈액내 산호성백혈구의 수, 율관절막의 일반적인 형태, NF- κ B 활성화와 관련된 면역조직학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 楡根皮 약침액이 처리된 CIA 유발 생쥐의 율관절세포에서는 NF- κ B 활성 관련 cytokine인 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA의 발현이 모두 농도 의존적으로 감소하였다.
2. 楡根皮 약침이 처리된 CIA 유발 생쥐에서 실험군이 대조군에 비해 혈액내 산호성백혈구의 수가 감소하였다.
3. 楡根皮 약침이 처리된 CIA 유발 생쥐의 율관절막내의 형태학적 변화에서 실험군이 대조군에 비해 율관절막의 자유면 두께 증가가 적고, 율관 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 율세포들의 출현도 감소하였으며 림프구 침윤도 적었고 섬유화가 감소하였으며, 면역조직화학 실험 영상분석에서 혈관신생성에 관여하는 MIP-2 양성반응도 감소하였다.
4. 楡根皮 약침이 처리된 CIA 유발 생쥐의 면역조직화학 실험 영상분석에서 실험군이 대조군에 비

해 NF- κ B p65, iNOS, COX-2, VCAM-1이 감소하였으며, Apoptosis는 증가하였다.

VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 : 175-89.
2. 나창수, 안병철. 류마티스성 관절염에 관한 임상적 고찰. 대한한의학회지. 1993 ; 14(2) : 206-15.
3. 황우준. 류마티스성 관절염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 1995 ; 12(1) : 281-90.
4. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 177-96.
5. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논문의 경향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(5) : 189-98.
6. 식품의약품안전청. 대한약전외한약(생약)규격집. 2006.
7. Hong ND, Rho YS, Kim JS. A study on efficacy of Ulmi cortex. Kor. J. Pharmacogn. 1990 ; 21 : 217.
8. Kang HJ, Kim KH, Jo HS, Hwang MS, Kim KS. Effect of *Ulmus davidiana* Planch(Ulmaceae) on T-Lymphocyte-producing cytokines such as IL-2, IL-6, and IFN- γ production in collagen-induced arthritis of rats. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005 ; 22(2) : 33-41.
9. Kil SY, Kim KH, Lee SD, Kim KS, Yoon JH. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch(Ulmaceae) on collagen-induced arthritis in mice. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005 ; 22(2) : 43-53.
10. Jo YW, Yoon JH, Kim KH, Lee SD, Kim KS. 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.
11. 변혁, 박인식, 조현석, 김갑성, 이승덕. 유근피(楡根皮) 약침이 Lipopolysaccharide 유발 류마티스 관절염 모델에서 MIF 활성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006 ; 23(6) : 117-32.
12. 김무진, 윤종화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 슬관절염의 침구치료에 관한 문헌고찰. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 191-201.
13. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 침구학(상). 서울 : 집문당. 1988 : 648-9.
14. Stephen LD, Koda-Kimble MA, eds : Rheumatic disorders, Applied Therapeutics : the clinical use of drugs. 6th, ed. Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, WA : Appl. Therap. Inc. 1995 ; 41 : 1-27.
15. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. Harrison's principle of internal medicine, 16th ed. New York : McGraw Hill, 2005 : 1968-77.
16. Leo AB, Joosten, Monique MA Helsen, Fons AJ van de Loo, Wim B van DE Bern. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/a mice. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
17. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. J Internal medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
18. Leech M, Metz CN, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis : evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum. 1999 ; 42 : 1601-8.
19. Marc Feldmann, Fionula M, Brennan and Ravinder N. Maini. Role of cytokines in rheumatoid arthritis, Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-440.
20. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1273-80.
21. Yasmina J, Catalina A, Carmen M, Alicia A, Irene G, Florencia R, Rosa P, Javier L. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res &

- Therapy. 2005 ; 7(5) : 1034-45.
22. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases ; role in arthritis. *Front Biosci.* 2006 ; 11 : 529-43.
 23. Yang Y, Kim HJ, Woo ER, Park J. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants(III). *Kor K Pharmacogn.* 1996 ; 27 : 105-10.
 24. Lee YJ, Han JP. Antioxidative activities and nitrite scavenging ability of extracts from *Ulmus Davidiana*. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 2000 ; 29(5) : 893-9.
 25. 김창순, 이중명, 최장욱. 느릅나무 근피의 화학조성분 및 항균성 물질(II). *목재공학.* 2003 ; 31(1) : 16-21.
 26. 이은방. 느릅나무 수피 엑기스가 흰쥐의 위염, 위궤양 및 발부종에 미치는 영향. *약학회지.* 1995 ; 39(6) : 671-5.
 27. Carlene T, Luis AD, Nora GS, Lan LL, Antia HK, Raj M, Brian JN, Leslie JC, David AF. Responsive of human T lymphocytes to bacterial superantigens presented by cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis & rheumatism.* 1996 ; 39(1) : 125-36.
 28. Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor(interleukin 1). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 ; 78(4) : 2474-7.
 29. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 ; 83(22) : 8749-53.
 30. Saklatvala J. Interleukin 1 ; purification and biochemical aspects of its action on cartilage. *J Rheumatol.* 1987 May ; 14 Spec No : 52-4.
 31. Bunning RA, Russell RG, Van Damme J. Independent induction of interleukin 6 and prostaglandin E2 by interleukin 1 in human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 ; 166(3) : 1163-70.
 32. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B : ten years after. *Cell.* 1996 ; 87(1) : 13-20.
 33. Baeuerle PA. I κ B-NF- κ B structures : at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998 ; 95(6) : 729-31.
 34. Rothkotter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999 ; 72(1-2) : 157-65.
 35. Anggard E. Nitric oxide : mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994 ; 343(8907) : 1199-206.
 36. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation : the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991 ; 288(2) : 481-7.
 37. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 91(26) : 12383-7.