

원저

유근피 약침이 제2형 Collagen 관절염에서 MIF 활성화 억제 및 T세포 분화 조절에 미치는 영향

이창환 · 조재용 · 이승덕 · 김경호 · 박인식 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect to Inhibiting MIF Activation and Controlling of T Cell Specialization of *Ulmus Davidiana Planchon* Herbal Acupuncture on Type II Collagen-induced Arthritis in Mice

Lee Chang-hwan, Cho Jae-yong, Lee Seung-deok, Kim Kyung-ho, Park In-shik and Kim Kap-sung

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Rheumatoid arthritis(RA) is a general, chronic, inflammatory and auto-immune disease and it can lead to joint edema, pain, stiffness which are caused by an inflammation in synovium covering our joints.

Ulmus davidiana Planchon is a traditional herb used for the treatment on various inflammations, gastrointestinal trouble, ENT(ear, nose, and throat) disease, edema, cancer etc. and it works effectively on arthritis as well.

In these study to search for the treatment efficacy of *Ulmus davidiana Planchon* in RA, I measure manifestation of cytokine gene in synoviocyte treated with *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture and in EL-4 cell, manifestation of cytokine gene cell related to T-cell. And after *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture treatment in Collagen induced arthritis(CIA) which has been known by a general model of RA, DBA mice, I observed foot thickness, general shape of synovium, early cytokine induce CIA and, generation and mutation of cytokine related to the control of T-cell specialization. It comes to conclusion as follows.

1. In synovium treated with *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture, there was the decrease in MIF mRNA does-dependently. Incase of CIA mice treated with *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture, there were the decrease in the damage in synovium and generation of the MIF which is

· 접수 : 2008. 7. 11. · 수정 : 2008. 7. 21. · 채택 : 2008. 7. 21.
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교병원+한방병원 침구과
Tel. 031-916-9115 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

related to induction of the early RA cytokine and IL-6 proinflammatory cytokine.

2. In case of EL-4 treated with *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture, there were decrease in the manifestation of the IL-2 mRNA, but the increase in the manifestation of the IL-4 does-dependently.

3. In the synovium of CIA mice treated with *Ulmus davidiana Planchon* herbal acupuncture, there were the decrease in generation of IL-2, IL-12 and CD-28, but the increase in generation of IL-4.

These result suggest that *Ulmus davidiana Planchon* can block the process of the early RA by Inhibiting MIF activation, and mitigate Rheumatoid Arthritis by controlling Tcell specialization.

I. 서론

류마티스 관절염은 연부조직 특히 여러 관절에 비 특이적인 염증성 반응을 만성적으로 야기하고, 동통과 강직이 특징적으로 나타나는 질환이다¹⁾.

류마티스 관절염이 면역질환임이 알려지면서 면역 반응에 변화를 주는 약물로 금 제재와 면역 억제제가 도입되었고, 최근에는 분자생물학 연구의 발달로 인해 류마티스 관절염의 병인이 조금씩 밝혀짐에 따라 생물학적 치료제가 개발되어 임상에서 사용되고 있다²⁾.

류마티스 관절염은 한의학의 痺症과 歷節風 등의 증상과 유사하다고 볼 수 있다.

원인으로는 평소 內因으로 氣血不足하고 榮衛不固하거나 肝腎이 不足한데 外因으로 風寒濕 三氣의 內襲을 받아 발생하는 것으로 보고, 이에 따라 대체로 風, 寒, 濕, 熱痺, 瘀痰阻經, 肝腎虧虛로 나누어 辨證하여 藥物療法과 鍼灸療法, 外治法 등을 행하게 된다³⁾.

楡白皮(Ulmi Cortex)는 느릅나무(*Ulmus macrocarpa* Hance)의 코르크층을 벗긴 樹皮로서⁴⁾ 각종 염증성 질환에 사용되어 왔으며, 관절염에 대해서도 좋은 효과를 보이고 있음이 임상뿐만이 아니라 실험적으로도 밝혀지고 있다⁵⁻⁸⁾. 최근에는 유근피의 관절염에 대한 치료 효과를 실험적으로 입증하려는 노력이 다양하게 이루어지고 있는데, 류마티스 관절염 치료의 최신 경향인 생물학적 치료제의 기전과 유사한 접근을 하고 있다. 이와 관련해 in vivo와 in vitro 실험에서 유근피가 제2형 콜라겐으로 유발된 관절염에서 interleukin(IL)-2, IL-6, interferon(INF)- γ , IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α 생성을 감소시키거나 억제시키고, IL-4 및 IL-10를 증가시키는 효과가 있는 것으로 보

고되었으며, Lipopolysaccharide(LSP)로 유발시킨 관절염에서 macrophage migration inhibitory factor (MIF)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS), TNF- α , nuclear factor(NF)- κ B, IL-2를 감소시키거나 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다⁹⁻¹³⁾

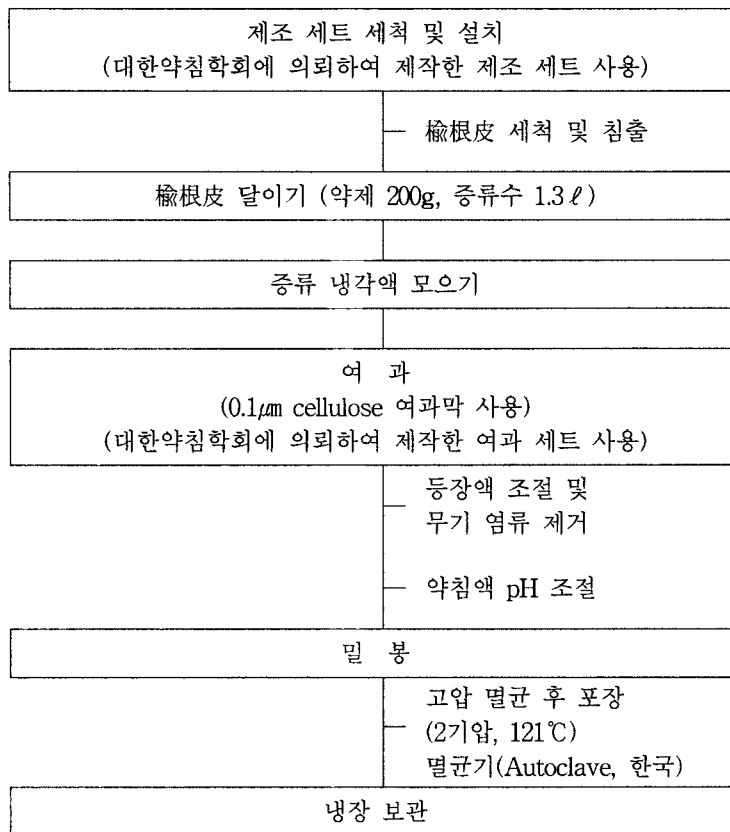
이와 같은 보고를 토대로, 저자는 유근피가 초기 류마티스 관절염의 진행을 차단하고, 유발된 관절염을 완화시키는 효과가 있음을 가정하고, in vitro 실험을 통해 CIA 유발된 DBA 생쥐에서 윤활관절세포를 적출, 배양하여 류마티스 관절염 유발인자인 MIF의 유전자 발현 정도를 측정하고, EL-4 세포에서 T세포 분화 관련 cytokine인 IL-2, IL-4의 유전자 발현 정도를 측정 하였으며, in vivo에서 CIA 유발 DBA 생쥐의 인체 犢鼻(ST₃₅, Dubai)에 상응하는 관절부위에 유근피 약침을 시술한 후 발 두께, 윤활관절막의 일반적인 형태, 초기 류마티스 관절염 유발에 관여하는 cytokine인 MIF와 전염증 cytokine IL-6, T세포 분화 관련 cytokine인 IL-2, IL-12, IL-4, T세포의 co-stimulatory signal인 CD-28 양성반응세포를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

태령 6주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트, 대한민국)를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.



Scheme 1. Making process of *Ulmus davidiana* planch herbal acupuncture solution

2) 약침액

榆根皮 약침액은 대한약침학회의 GMP 기준 시설 하에서 제조하였다(Scheme 1).

3) 약침기

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

2. 방법

1) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 윤활관절세포는 CIA 관절염이 유발된 생쥐 무릎관절에서 적출하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 윤활관절주머니를 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 웰진, 대한민국)에 2시간동안 반응하여 윤활관절막을 분리하고 잘게 잘랐다. 0.1% collagenase에 37℃에서 1시간 동안 처리 한 다음

3000 rpm에 5 분간 원심분리하여 37℃, 5% CO2 incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma, USA)가 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 Phosphate Buffered Saline(PBS)로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3-5 회 계대배양 세포를 사용하였다. 한편 T세포 분화와 관련된 실험에 사용한 생쥐 EL4 세포는 한국세포주 은행에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO2 incubator에서 10% FBS가 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 두 세포주 모두 오염방지를 위해 항생제로 1,000U/ml penicillin, 1,000µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)를 첨가하였다.

2) 세포주를 이용한 유전자 발현 변화 조사

(1) 실험군 분류

무 처치한 정상군(Normal group), 제2형 콜라겐 유발 관절염 유발군인 대조군(Control group), 제2형 콜라겐 유발 관절염 유발군에 유근피약침을 시술한 실험

험군(Experimental group)으로 나누어, 각 군에 각 10 마리씩 배정하였다.

(2) 율관절세포내 CIA 유발 관련 cytokine 유전자 발현 변화 조사

유근피 약침액이 macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사 중합 효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 율관절세포 - 5×10^5 cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Final 1 ng/ml)를 1시간 처리하여 MIF mRNA 발현을 유도한 후 유근피 추출액을 회석하여 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} 및 10^{-1} 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma, USA)를 사용하여 추출하고 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 MIF primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table. 1).

PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β -actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

(3) Th1과 Th2 세포 분화 조절 유전자의 발현 변화 조사

Th1 세포 분화의 주도적 역할을 하는 cytokine은

interleukin(IL)-2이다. 유근피 약침액이 IL-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해서 concanavaline (CON) A(Sigma, USA)를 이용하여 EL4 세포의 Th1 skewed condition을 유발시켰다. EL4 세포 - 5×10^5 cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 CON-A $20 \mu\text{g/ml}$ 를 1시간 처리하여 IL-2 mRNA 발현 증가를 유도한 다음 유근피 추출액을 회석하여 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} 및 10^{-1} 로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 EL4 세포의 RNA를 trizol reagent를 사용하여 추출한 다음 fluorometer로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후, IL-2 primer를 PCR machine으로 온도 조건에 따라 반응시켰다(Table 1).

Th2 세포 분화의 주도적 역할을 하는 cytokine은 IL-4이다. 유근피 약침액이 IL-4 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해서 PMA와 4-tert-Octylphenol (OP, Sigma, USA)를 이용하여 EL4 세포의 Th2 skewed condition을 유발시켰다. EL4 세포 - 5×10^5 cells/well을 6well에 plating 하고 12시간 후에 PMA (1 ng/ml)과 OP($5 \mu\text{m/ml}$)를 1시간 처리하여 IL-4 mRNA 발현 증가를 유도한 다음 유근피 추출액을 회석하여 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} 및 10^{-1} 로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 EL4 세포의 RNA를 trizol reagent를 사용하여 추출한 다음 fluorometer로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후, IL-4 primer를 PCR machine으로 온도 조건에 따라 반응시켰다(Table. 1).

Table 1. The Primer of MIF, IL-2, IL-4 and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product (bp)	No. of cycles
MIF	sense	5'-CACCATGCCTATGTTTCATCGTGAACA-3'	404	35
	antisense	5'-GGGCTCAAGGCGAAGGTGGAACCGTT-3'		
IL-2	sense	5'-AACAGCGCACCCACTTCAA-3'	442	35
	antisense	5'-TTGAGATGATGCTTTTACA-3'		
IL-4	sense	5'-TAGTTGTCATCCTGCTCTT-3'	404	35
	antisense	5'-CTACGAGTAATCCATTTGC-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

Abbreviation

MIF, macrophage migration inhibitory factor; IL-2, interleukin-2; IL-4, interleukin-4.

3) CIA 생쥐를 이용한 면역조직학적 변화 관찰

(1) 항원제조와 콜라겐 유발 관절염 (Collagen induced arthritis; CIA)의 유발

CIA를 유발을 위해 우선 native bovine type II collagen(CII, Chondrex, USA)을 10mM acetic acid에 4 mg/ml의 농도로 녹인 후 4°C에서 12시간동안 교반하였다. CII와 4mg/ml의 complete Freund's adjuvant containing Mycobacterium tuberculosis strain H37RA (CFA, Chondrex)를 동량으로 섞은 후 균질기를 이용하여 1,000rpm의 속도로 혼합하였다. CIA의 유발을 위한 1차 접종을 CII와 CFA 혼합액 50 μ l를 꼬리연결 근육부위에 피내주사를 통해 실시하였으며, 1차 접종 2주후에 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) 유근피 약침의 시술

CIA 유발 제3일부터 제28일까지 유근피 약침액 50 μ l/kg을 유근피약침군인 실험군의 편측 犢鼻(ST₃₅, Dubai)에 매일 시술하였다.

(3) 윤활관절 표본 제작

CIA 유발 제28일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장 관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(4) 윤활관절막내 섬유화 조사

윤활관절막내 콜라겐섬유의 분포 변화 관찰은 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 통해 이루어졌다. 우선 무릎관절 표본은 Weigert's iron hematoxylin에서 20분동안 핵 염색한 다음 Van Gieson's 염색용액에서 5분간 콜라겐섬유에 대한 염색을 실시하였다.

(5) 윤활관절막내 CIA 유발 관련 Cytokine의 변화 조사

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF과 pro-inflammatory cytokine인 IL-6의 윤활관절막내 분포 변화를 조사하기 위해 항체를 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 rabbit anti mouse MIF(1:200, Santa Cruz Biotech, USA)과 rabbit anti mouse IL-6R (1:200, Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-rabbit IgG(DAKO, Denmark)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex(DAKO, Denmark)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 대조 염색하여 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

(6) 윤활관절막내 T 세포 분화 변화 조사

Th1 세포 분화에 관여하는 cytokine인 IL-2와 IL-12, T 세포의 co-stimulatory signal인 CD28 그리고 Th 2 세포 분화에 관여하는 cytokine인 IL-4의 윤활관절막내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse IL-2(1:100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-mouse IL-12(1:200, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-mouse CD28 (1:200, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 mouse anti-mouse IL-4 (1:200, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시한 후 관찰하였다.

4) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학적 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma plot 2000을 이용하여 student t-test를 통해 α 값 0.05 이하인 경우 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. CIA 유발 관련 Cytokine 억제

1) 율관절세포의 MIF mRNA 발현 억제

PMA 자극에 의한 율관절세포에서의 MIF mRNA 발현은 증가하였는데, 율근피 약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극 시 발현되는 MIF mRNA 발현량에 비해 10⁻⁴에서 13%, 10⁻³에서 15%, 10⁻²에서 15%, 10⁻¹에서 24%가 감소하였다.(Fig. 1-A)

2) 율관절막내 MIF와 IL-6 생성 억제

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 MIF 양성반응세포는 율관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 대조군 2218±167pixel은 정상군 296±13pixel에 비해 유의성 있게 증가하였으나, 실험군은 1343±24pixel로 대조군의 2218±167pixel에 비교해 유의성 있는 감소를 나타내었다(P<0.05)(Table 2, Fig. 1-B).

Table 2. The Image Analysis for CIA Model Cytokine after YGP Acupuncture Solution (pixel)

Objective	Group		
	NOR	CON	EXP
MIF	296±13	2218±167	1343±24*
IL-6	102±5	965±33	304±10*

(Image analysis for 200,000 pixels / Range of intensity : 80-120)

Abbreviation

M ± S.D.; Mean ± Standard Deviation; MIF, macrophage migration inhibitory factor; IL-6, interleukin-6; NOR: None-treated group; CON: Type II collagen induced arthritis group; EXP: YGP solution treated group after CIA model.

*, P < 0.05 compared with control group.

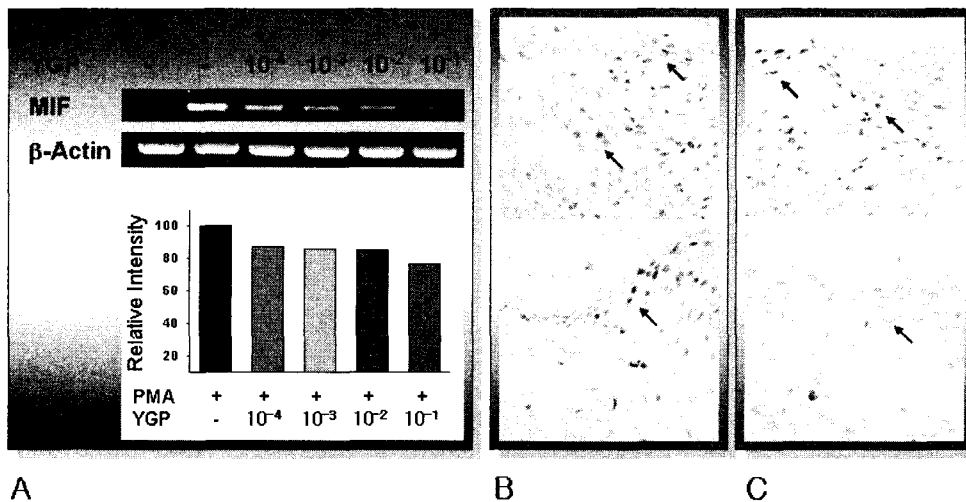


Fig. 1. Inhibition of CIA elicited cytokine by YGP acupuncture solution

A. Inhibition of PMA-induced MIF mRNA expression by YGP. The synoviocytes cells were treated with PMA for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (10⁻⁴ - 10⁻¹) of YGP solution, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced MIF mRNA expression and were dose-dependantly decreased in YGP treated synoviocytes. B. Decrease of MIF (MIF (arrow) immunohistochemistry, ×400). C. Decrease of IL-6 (IL-6 (arrow) immunohistochemistry, ×400). Uppert-box, Con.; Lower-box, Exp.

Abbreviation

PMA,phorbol-12-myristate-13-acetate; MIF, macrophage migration inhibitory factor; IL-6, interleukin-6; CIA, Collagen Induced Arthritis; YGP, Ulmus davidiana Planchon; CON, Type II collagen induced arthritis group; EXP, YGP treated group after CIA model.

한편 전염증효소인 IL-6의 양성반응세포의 분포가 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 IL-6 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 세포막 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-6 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 965 ± 33 pixel로 정상군 102 ± 5 pixel에 비해 유의성 있게 증가하였지만, 실험군은 304 ± 10 pixel로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다($P < 0.05$)(Table 2, Fig. 1-C).

2. T 세포 분화 조절을 통한 CIA 치료 기전

1) T 분화 관련 Cytokine 유전자 발현 조절

EL-4 세포에서 CON-A에 의한 IL-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 유근피 약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 유근피 약침액 처리 후 IL-2 mRNA 발현량은 10-4에서 21%, 10-3에서 28%, 10-2에서 32%, 10-1에서 37%가 감소하였다(Fig. 2-A).

한편 EL-4 세포에서 PMA와 OP 자극에 의한 IL-4 mRNA 발현은 증가하였는데, 유근피 약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 증가되었다. 유근피 약침액 처리 후 IL-4 mRNA 발현량은 10-4에서는 14% 감소, 10-3에서 11%, 10-2에서 26%, 10-1에서 42%가 증가하였다(Fig. 2-B).

2) 윤활관절막내 T 분화 관련 Cytokine 생성 억제

Th1 분화의 주도적인 cytokine인 IL-2의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 IL-2 양성반응세포는 윤활관절막 자유면에서 기저부까지 골고루 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-2 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 568 ± 10 pixel로 정상군 106 ± 12 pixel에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었고, 실험군은 240 ± 5 pixel로 대조군 568 ± 10 pixel에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.05$)(Table 3, Fig. 3-A).

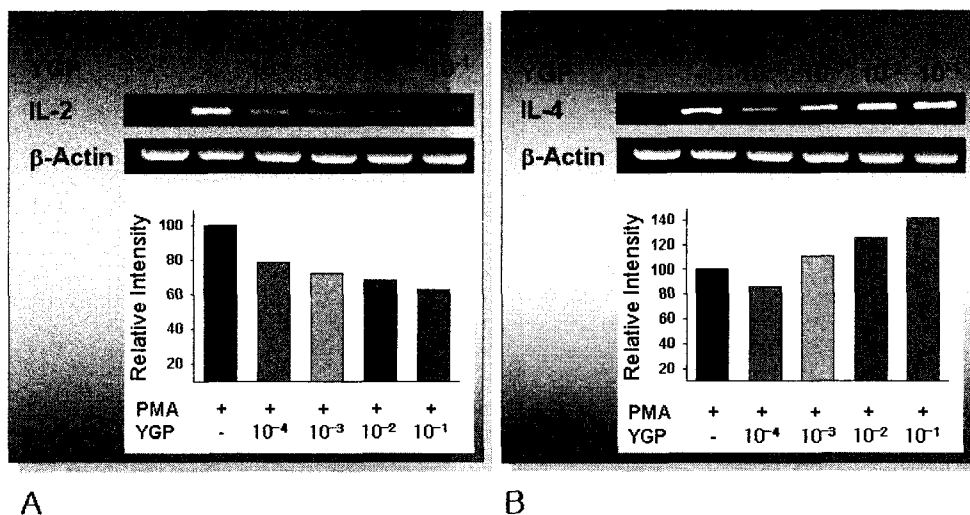


Fig. 2. Regulation of T cell differentiation by YGP herbal acupuncture solution

A. Inhibition of Th1 cell differentiation. The EL-4 cells were treated with CON-A for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (10^{-4} - 10^{-1}) of YA, and the cells were further incubated for 24 hours. The CON-A induced IL-2 mRNA expressions were dose-dependantly decreased in YA treated EL-4 cells. B. Induce of Th1 cell differentiation. The EL-4 cells were treated with PMA and OP for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (10^{-4} - 10^{-1}) of YA, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-OP induced IL-4 mRNA expressions were dose-dependantly increased in YGP acupuncture solution treated EL-4 cells.

Abbreviation

CON-A, concanavaline A; OP, 4-tert-Octylphenol; YA, YGP herbal acupuncture solution; YGP, Ulmus davidiana Planchon.

Table 3. The Image Analysis for Changes of T Cell Differentiation intricate Cytokine after YGP Acupuncture Solution

Objective	Group		
	NOR	CON	EXP
IL-2	106±12	568±10	240±5*
IL-12	341±10	2221±78	1383±51*
CD28	118±13	1144±74	574±24*
IL-4	115±10	394±40	676±22*

(pixel)

(Image analysis for 200,000 pixels / Range of intensity : 80-120)

Abbreviation

NOR; None-treated group; CON; Type II collagen induced arthritis group; EXP; YGP treated group after CIA model.

*, P < 0.05 compared with control group.

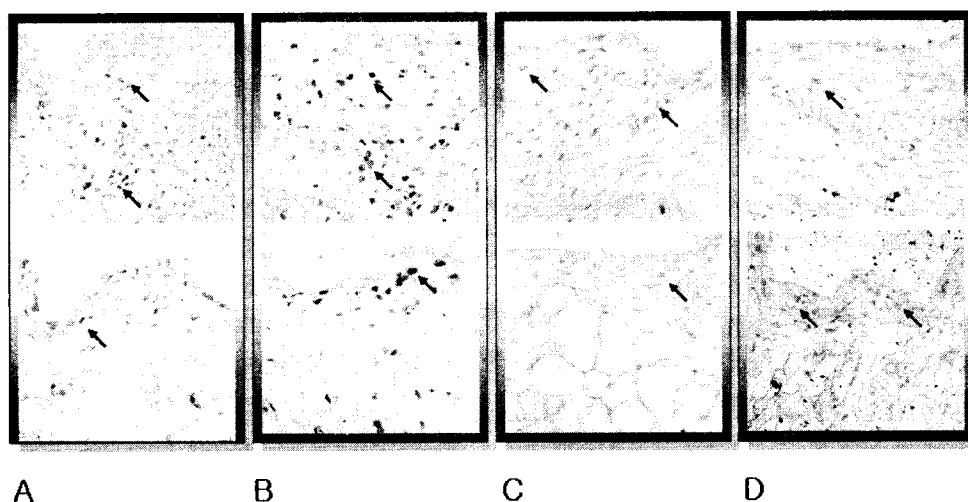


Fig. 3. Regulation of T cell differentiation by YGP herbal acupuncture solution(Upper-box, CON; Lower-box, EXP)

- A. Decrease of IL-2 (IL-2 (arrow) immunohistochemistry, ×400).
- B. Decrease of IL-12 (IL-12 (arrow) immunohistochemistry, ×400).
- C. Decrease of CD28 (CD28(arrow) immunohistochemistry, ×400).
- D. Increase of IL-4 (IL-4 (arrow) immunohistochemistry, ×400).

Abbreviation

NOR: None-treated group; CON: Type II collagen induced arthritis group; EXP: YGP treated group after CIA model; YGP, Ulmus davidiana Planchon.

Th1 분화 촉진을 유도하는 IL-12의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 IL-12 양성반응세포는 윤활관절막 자유면에 기저부까지 골고루 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-12 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 2221±78pixel로 정상군 341±10pixel에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었고, 실험군은 1383±51pixel로 대조군 2221±78pixel에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 3-B).

T 세포의 co-stimulatory signal인 CD28의 양성반

응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 CD28 양성반응세포는 윤활관절막 자유면에 기저부까지 골고루 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. CD28 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 1144±74pixel로 정상군 118±13pixel에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었고, 실험군은 574±24pixel로 대조군 1144±74pixel에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 3-C).

Th2 분화의 주도적인 cytokine인 IL-4의 양성반응세포의 분포는 대조군과 실험군 모두에서 정상군에

비해 증가하였다. 이러한 IL-4 양성반응세포는 윤활관절막 자유면의 모세혈관 주변에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-4 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 394±40pixel로 정상군 115±10 pixel에 비해 증가하였으며, 실험군은 676±22pixel로 대조군 394±40pixel에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 3, Fig. 3-D).

3. CIA 생쥐에서 조직 손상 완화

1) 발 두께 변화

정상군에 비해 대조군에서는 부종에 의한 발 두께가 크게 증가하였으며, CIA 유발 제7일 경과 후 4.46±0.15mm로서 가장 큰 증가를 보였다. 실험군에서는 제7일 3.71±0.14mm, 제14일 3.21±0.1mm, 제21일차 2.99±0.16mm 및 제28일 2.49±0.14mm로서 대조군에 비하여 각각 유의성(P<0.05)있는 변화가 관찰되었다(Table 4, Fig. 4-A).

2) 일반적인 형태 변화

CIA 유발 후 윤활관절막의 자유면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께

증가였다. 윤활강쪽으로 많은 돌기(filopodia)를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 자유면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 자유면쪽으로 많은 수의 림프구 이주가 관찰되었고, 그 주변에서 모세혈관의 수적 증가가 관찰되었다. 그러나 실험군은 대조군에서 나타난 형태변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 대조군에 비해 윤활관절막의 세포과형성은 감소하였고, 표면상태도 매끄럽게 나타났다. 또한 윤활관절막 자유면으로의 이주 림프구와 모세혈관 출현이 감소하였다(Fig. 4-B).

3) 윤활관절막내 섬유화 감소

CIA 유발 후 윤활관절막내 주된 형태학적 변화 중 또 하나는 섬유화(fibrosis)와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적의 증가이며 섬유화는 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 관찰되었다. 섬유화부위에서는 세포가장자리가 잘 발달된 섬유모세포 침적이 증가된 것으로 관찰되었다. 그러나 실험군에서는 대조군에 비해 낮은 섬유화가 일어났는데, 콜라겐섬유가 윤활관절막 자유면 기저부에서만 관찰되었고, 또한 섬유화 주변에 침적하는 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 4-C).

Table 4. Inhibition of Foot Thickness in Collagen Induced Arthritis (CIA) Evoked Mouse by YGP Herbal Acupuncture

Objective	Group		
	NOR	CON	EXP
1st day	1.74±0.12	1.81±0.18	1.75±0.15
7th day	1.75±0.15	4.46±0.15	3.71±0.14*
14th day	1.74±0.12	4.01±0.19	3.21±0.11*
21th day	1.79±0.11	3.89±0.18	2.99±0.16*
28th day	1.75±0.17	3.85±0.15	2.49±0.14*

Abbreviation

YGP : Ulmus davidiana Planchon; M ± S.D: Mean ± Standard Deviation; NOR: None-treated group; CON: Type II Collagen induced arthritis group; EXP: YGP herbal acupuncture group after CIA model.
 *, P < 0.05 compared with control group.

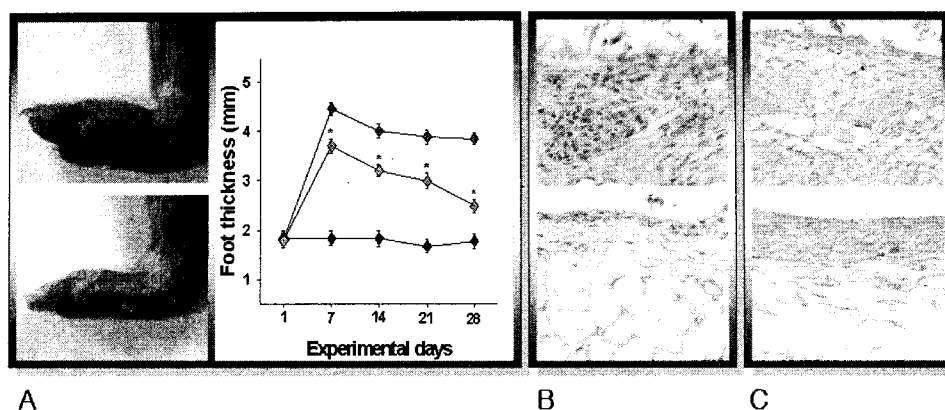


Fig. 4. Mitigation of CIA in foot and knee joint by YGP Herbal Acupuncture

A. Inhibition of foot thickness (upper photo, CON; lower photo, EXP ×4).

B. Inhibition of CIA damaged synovial membrane (upper photo, CON; lower photo, EXP, H&E, ×40).

C. Inhibition of fibrosis (upper photo, CON; lower photo, EXP, H&E, ×40).

Abbreviation

CON, Type II collagen induced arthritis group; EXP, YGP herbal acupuncture group after CIA model.

*, P < 0.05 compared with control group.

IV. 考 察

류마티스 관절염은 그 병적 증상이 주로 가동관절에 대칭적으로 나타나는 전신성 만성 염증 질환이며 퇴행성관절염과는 다르게 자가면역성을 바탕으로 한다. 류마티스 관절염은 전 세계 인구의 약 1% 정도에서 발생하지만¹⁴⁾ 그 병인 발병기전에 대하여 잘 알려져 있지 않을 뿐 아니라 장기간의 진단과 치료가 어려운 난치병이어서 심각한 사회적 경제적 문제를 일으키는 요인이 되고 있다. 류마티스 관절염 환자의 관절조직에서는 초기에는 염증세포의 침윤, 활막염, 활막의 증식에 의한 pannus 형성, 새 혈관 형성 등이 발달하며 이런 상태가 만성적으로 지속되면서 관절연골과 뼈의 파괴가 시작되고 결국 관절 부전상태에까지 이르기까지 한다¹⁵⁾.

류마티스성 관절염의 발병 원인에도 불확실한데 반해, 류마티스성 관절염 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다. 요약해 보면, 운활액내의 type II collagen 역가 증가¹⁶⁾, macrophage migration inhibitory factor(MIF)의 증가¹⁷⁾, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 증가^{18,19)}, 염증성 전사인자인 Nuclear factor- κ B의 활성화와 염증효소 cyclooxygenase(COX)-2와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 증가^{20,21)}, 단백질분해효소(matrix metalloproteinase ; MMP)의 증

가^{22),23)} 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

한의학에서 류마티스 관절염은 痺證과 歷節病에 해당한다고 볼 수 있으며²⁴⁾, 문헌적으로는 《黃帝內經·素問》 痺論에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”²⁵⁾라 하여 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, 張仲景은 《金匱要略》에서 “歷節痛不可屈伸”, “其痛如掣”, “諸肢節疼痛 身體羸羸 脚腫如脫”²⁶⁾하다고 기술하고 증상에 따라 처방을 달리 하였다. 巢元方은 《諸病源候論》²⁷⁾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.

류마티스 관절염의 치료의 목적은 질병 활성도를 떨어뜨리고, 진행을 억제하여 최종적으로는 관절 손상과 변형을 예방하는 데 있다. 류마티스 관절염의 약물치료는 과거 비스테로이드 소염제를 중심으로, 부작용이 적은 약제부터 시작하여 점차 강력한 치료로 이행하는 ‘피라미드 전략’을 사용해 왔다. 그러나, 류마티스 관절염은 발병 2년 이내에 대부분 관절 손상이 시작되고, 일단 관절 파괴가 진행되기 시작하면 질병의 효과적 억제가 어렵기 때문에 최근에는 진단 초기부터 적극적으로 항류마티스 약제(Disease modifying anti-rheumatic drug, DMARDs)를 사용하며 특히 이들을 병합하는 강력한 치료를 시행하고 있다. 이러한 치료 패러다임의 변화와 함께 2000년대로 접어들면서

‘생물학적 약제(biologic agent)’의 개발과 사용으로 이 제는 ‘생물학적 치료(biologic therapy)’의 시대로 접어들었다고 해도 과언이 아니다.

韓醫學의 發病原因은 風寒濕 邪氣의 侵入과 肝腎의 虛損을 주된 요인으로 간주하고 있으며, 邪氣의 侵入은 正氣의 虛弱과 관련있다고 볼수 있다. 風寒濕 邪氣에 대한 접근은 항원항체반응에 해당이 되고, 제반 증상은 韓醫學의 病理의 副産物인 瘀血과 濕痰에 해당이 되며, 肝腎의 虛損이나 正氣의 虛弱은 면역기능에 대한 인식으로 볼수 있다²⁸⁾. 이에 溫腎補腎, 益氣溫陽, 益腎通絡, 益氣養營, 補益肝腎, 益氣益腎 및 補氣益血등의 扶正法과 祛風散寒化濕, 祛風定痛, 祛痰散結, 活血化瘀, 活血通經 등의 祛邪法을 함께 응용하여 扶正祛邪法으로 치료하게 된다²⁹⁾.

최근에는 이를 바탕으로 항염, 진통, 면역조절의 효과를 실험적으로 검증하려는 연구³⁰⁻³²⁾가 진행중이며 이는 서양의학적 접근법 중에서 생물학적 치료법에 대한 접근 방법과 상당히 유사하다.

이러한 관점에서 유근피에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

유근피는 《東醫寶鑑》 湯液編에서 “유피는 성질은 짜하고 맛이 달며 독이 없다. 잘 나가게 하는 작용도 있기 때문에 대소변이 통하지 못하는 병에 주로 쓰인다. 오줌을 잘 나가게 하고 장위의 사열(腸胃邪熱)을 없애며 부은 것을 가라앉히고 5립을 풀리게 하며 불면증, 후합증을 낫게 한다”³³⁾ 라고 하였고, 《神農本草經》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”³⁴⁾라 하였으며, 《本草備要解析》에서는 “性味 甘滑下降”, “功用 行經脈, 利諸竅, 通二便, 滲濕熱, 滑胎產, 下有形留著之物”, “主治 治五麻腫滿, 喘嗽不眠, 療疥癬禿瘡, 消赤腫妬乳”³⁵⁾라 하였다. 《醫學入門》 本草 治濕門에 “滑利性甘平. 利水通便產易生. 心痛頭瘡當採實. 小兒癩熱用花淸”³⁶⁾이라 하였으니, 이러한 효능을 바탕으로 각종 염증성 질환, 위장질환, 이비인후과 질환, 종창, 암 등의 치료에 쓰이며 痺症, 현대의 류마티스 관절염에도 응용되고 있다.

대식세포 유주 억제 인자(Macrophage migration inhibitory factor ; MIF)는 1960년대에 T 림프구에서 유리되어 대식 세포의 유주를 억제하는 사이토카인으로 알려졌다. 이후에 MIF가 대식 세포의 탐식작용과 지연 면역 반응에 관련이 있음이 알려졌고 여러 면역 반응 및 MIF의 분자 생물학적인 특성에 대한 연구가 진행되어 왔다. MIF는 대식세포 및 림프구 면역기능

을 조절하는 중요한 역할을 하는데 패혈증, 류마티스 관절염, 지연성 과민반응, 염증성 폐질환, 악성 종양, 동맥경화 등에서 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 특히 류마티스 질환에서는 류마티스 관절염에서 MIF의 역할이 많이 연구되었다. 류마티스 관절염 환자의 혈청, 활액, 활막의 섬유세포에서 MIF의 농도가 현저하게 증가되어 있으며, TNF, IL-1, IL-6 IL-8의 유리를 유도하며, phospholipase A2, cyclooxygenase 2를 상향 조절하여 PGE2의 생합성을 촉진함이 보고되어 있다³⁸⁾.

류마티스 질환에서의 MIF에 대한 연구를 살펴보면, 류마티스 관절염에서는 환자의 염증성 활막 조직에서 높은 MIF의 발현이 확인 되었고, 활막의 MIF 발현 정도와 질병 활성도와의 연관성을 증명하여 류마티스 관절염에 항MIF 치료의 가능성을 보여주었다. 또한 MIF는 류마티스 관절염의 활막세포의 증식반응을 직접적으로 유도하는 것으로 보고되었고, 연소성 류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액에서 MIF가 증가되는 것으로 확인되었다³⁸⁾.

면역반응 유도는 상당부분이 분화된 도움 T 세포가 분비하는 cytokine에 의해서 결정된다. 즉 IL-12 등에 의한 Th1 cell 분화는 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity)이나 세포독성 T 세포 반응과 같은 세포성 면역반응(cell mediated immunity)을 유도하고, Ig G의 생산을 통한 opsonization를 촉진하는 반면, IL-4 등에 의한 Th2 cell 분화는 급성과민반응(acute type hypersensitivity)이나 호산구(eosinophil)의 활성화, B cell 활성을 통한 Ig E 생산을 촉진과 같은 체액성면역반응 (humoral immunity)를 유도한다. 또한 Th1 cell은 INF- γ 를 통해 Th2 반응을, Th2 cell은 IL-4를 통해서 Th1 반응을 억제한다. 평상시 Th1와 Th2 cell은 상호작용을 통해 면역균형이 유지되며, Th1 / Th2 cell 분화의 불균형은 면역 질환을 일으킨다³⁹⁾. IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-18의 자극에 의한 Th1 cell의 과도한 분화는 INF- γ , IL-11 TNF- β 등의 분비 증가를 유도하여 류마티스 관절염을 일으키는 원인이 된다. 본 실험의 RA군에서도 IL-2, IL-12 생성 증가가 확인되었는데, 이는 Th1 세포 분화 유도하는 T 세포내 CD28 costimulatory signal⁴⁰⁾을 증폭시키게 된다.

실험군은 윤활관절막내에서는 FLS의 세포과형성, 섬유화 등이 CIA보다 적었다. 이는 MIF 활성 억제에 의한 것으로 유근피 약침액이 PMA로 자극된 윤활관절세포에서 MIF mRNA의 발현을 농도 의존적으로

억제한다는 *in vitro*의 결과와 CIA 동물모델을 통해 유근피 약침 처리 후 MIF 양성반응세포의 분포 감소가 관찰된 *in vivo*의 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 유근피 약침의 MIF 활성 억제는 IL-6 생성 유도를 억제하였다. 특히 유근피 약침액은 EL-4세포에서 농도-의존적으로 IL-2 mRNA의 생성을 억제하였고, IL-4 mRNA 발현은 증가시켰다. 또한 CIA 동물모델에서는 Th1 세포분화와 관련된 IL-2, IL-12 그리고 CD28의 생성은 억제되었고, Th2 세포분화와 관련된 IL-4의 생성은 유도되었다. 이는 유근피가 Th1/Th2 분화 불균형인 류마티스 관절염에 대한 면역학적 균형을 조절함으로써 치료 효과에 대한 가능성을 기대하게 한다. 이상의 결과로 유근피약침액은 MIF의 활성 억제를 통해 초기 류마티스성 관절염의 진행을 차단하고 Th1/Th2 분화 조절을 통해 류마티스성 관절염을 완화시키는 치료 효과를 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

유근피약침액이 제2형 collagen 관절염에서 MIF 활성억제 및 T세포 분화조절에 미치는 영향을 조사하기 위해 행해진 본 연구는 유근피 약침액이 처리된 윤희관절세포에서 류마티스 관절염 유발 cytokine 유전자 발현과, EL-4 세포에서 T 세포 분화 관련 cytokine 유전자 발현을 측정하였다. 그리고 CIA 유발 생쥐 犢鼻(ST₃₅, Dubai)에 유근피 약침을 시술한 후 발 두께, 윤희관절막의 일반적인 형태, 초기 CIA 유발 cytokine 및 T cell 분화 조절에 관여하는 cytokine 생성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유근피 약침액이 처리된 윤희관절세포에서는 MIF mRNA 발현이 농도-의존적으로 감소하였고, 유근피 약침이 시술된 CIA 생쥐에서는 윤희관절막내 손상 감소, 초기 류마티스 관절염 유발 cytokine인 MIF와 전염증효소 IL-6이 유의성 있게 감소되었다.
2. 유근피 약침액이 처리된 EL-4에서는 IL-2 mRNA 발현은 농도-의존적으로 유의성 있게 감소하였고, IL-4 mRNA 발현은 농도-의존적으로 유의성 있게 증가하였다.
3. 유근피 약침이 시술된 CIA 생쥐 윤희관절막에서 IL-2, IL-12 그리고 CD28의 생성은 유의성

있게 감소하였고, IL-4의 생성은 유의성 있게 증가하였다.

VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의 학사. 1996 : 155-72.
2. 양형인. 류마티스 관절염의 최신 치료. 경희의학. 2004 ; 20(1) : 1-3.
3. 이학인, 양재하, 권순주. 류마티드 관절염의 동서의학적 고찰. 경산대 濟韓東醫學術院 論文集. 1999 ; 4(1) : 199-209.
4. 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 서울 : 동원문화사. 2002 : 295
5. 홍나두, 노영수, 김남재, 김진식. 榆白皮의 藥效研究. 생약학회지. 1990 ; 21(3) : 217-22.
6. 은계순, 송원영. 암세포주에 대한 유근피 n-BuOH 분획과 함암제의 병용효과. 생약학회지. 1994 ; 25(2) : 144-52.
7. 임종필, 최훈. 榆白皮 물 추출물이 흰쥐의 胃潰瘍에 미치는 影響. 韓藥作誌. 2002 ; 10(3) : 177-80.
8. 양영렬, 김영주, 김경화, 오유진. 유근피로부터 단백질다당체의 분리 및 항암 면역활성 연구. 한국생물공학회지. 2001 ; 16(6) : 547-53.
9. 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. 대한침구학회지. 2005 ; 22(2) : 33-41.
10. 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. 대한침구학회지. 2005 ; 22(2) : 43-53.
11. 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. 대한침구학회지. 2005 ; 22(2) : 93-101.

12. 변혁, 박인식, 조현석, 김갑성, 이승덕. 유근피 (榆根皮) 약침이 Lipopolysaccharide 유발 류마티스 관절염 모델에서 MIF 활성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006 ; 23(6) : 117-32.
13. Song IG, Lee SD, Kim KS. Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Ulmus Davidiana Planch(Ulmaceae) in Collagen-induced Arthritis Rats. 대한침구학회지. 2007 ; 24(2) : 83-100.
14. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. Arthritis Rheum. 1999 ; 42(3) : 415-20.
15. 윤지희. 실험동물모델을 통해 얻은 유마티스 관절염 발병기전에 대한 교훈. Hanyang Medical Reviews. 2005 ; 25(2) : 53-66.
16. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van DE Bern WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
17. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. Internal Medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
18. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis k, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor in Rheumatoid arthritis : evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum. 1999 ; 42 : 1601-8.
19. Feldmann M, Brennan FM and Maini RN. 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. Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Cañas I, Rosignoll F, Gomariz RP, Leceta J. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. & Therapy. 2005 ; 7(5) : R1034-45.
22. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases ; role in arthritis. Front Biosci. 2006 ; 11 : 529-43.
23. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. J Biol chem. 2000 ; 275 : 444-50.
24. 이재동. 류마티스 관절염의 한방 치료. 경희의학. 2004 ; 20(1) : 4-9.
25. 田溶敏. 再編黃帝內經素問. 서울 ; 대성문화사. 1999 ; 124.
26. 張仲景. 仲景全書. 서울 : 대성문화사. 1992 : 364-9.
27. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 51.
28. 최도영 외 10명. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 177-96.
29. 오영선, 오민석, 송태원. 류마티스 關節炎의 韓·洋方의 藥物治療의 最新傾向 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2002 ; 11(1) : 217-35.
30. 안형준, 김갑성. 생쥐에서 녹용약침액이 자가항원제시형 Cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염 억제에 미치는 효과. 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 104-16.
31. 이상훈, 홍승재, 김수영, 양형인, 이재동, 최도영, 이두익, 이윤호. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독 약침의 류마티스 관절염 치료 효과 연구. 대한침구학회지. 2003 ; 20(6) : 80-8.
32. 신동수, 김영일, 이현. 목과(木瓜) 약침(藥鍼)이 Collagen-induced Arthritis 억제 및 면역조절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007 ; 24(3) : 127-43.
33. 허준. 동의보감. 서울 ; 여강출판사. 1994 : 2798.
34. 吳普 外. 神農本草經. 北京 : 科學技術文獻出版

- 社. 1996 : 38.
35. 楊東喜. 本草備要解釋. 서울 : 일중사. 1991 : 360.
36. 李槲. 編註醫學入門. 서울 : 대성문화사. 1990 : 194.
37. 송주경, 신현영, 이유선, 황재희, 권양숙, 정연주, 이윤종, 강성욱. 류마티스 관절염에서 염증 관련 유전자의 다형성 연구. 대한류마티스학회지. 2005 ; 12(2) : 108-15.
38. 조미라. 류마티스관절염 활막세포에서 NF- κ B 신호전달을 통한 MIF의 SDF-1 생성 유도. Immune Network. 2007 ; 7(1) : 39-47.
39. Goldby RA, Kindt TK, Osborne BA, Kuby J. Immunology, 5th Edition. New York. 2003 : 287-91.
40. Ando O, Suemoto Y, Kurimoto M, Horikawa T, Ichihashi M. Deficient Th1-type immune responses via impaired CD28 signaling in ultraviolet B-induced systemic immunosuppression and the restorative effect of IL-12. J Dermatol Sci. 2000 ; 24(3) : 190-202.