

Paeoniflorigenone 작약성분의 항염효과

김하얀 · 한용문[#]

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학교실

(Received January 19, 2012, Revised February 8, 2012, Accepted February 9, 2012)

Anti-inflammatory Effect of Paeoniflorigenone Isolated from Paeoniae Radix

Hayan Kim and Yongmoon Han[#]

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — In Northeast Asia, Paeoniae Radix has been used in treatments of inflammation-causing diseases such as arthritis for many centuries. Paeoniflorin, one of the principle bioactive monoterpene glucosides from the paeony root, is reported to be mostly responsible for the effectiveness of the treatments. However, the anti-inflammatory effect of a monoterpene, paeoniflorigenone (PFG) which partially has the moiety of paeoniflorin minus a glucose structure is unknown. Thus, the aim of this work was to investigate anti-inflammatory activity of PFG. For the investigation, PFG activity on the NO (nitric oxide) production from LPS-stimulated macrophages, and the anti-inflammatory effect was tested in the animal model of septic arthritis caused by *Candida albicans*, a major etiological agent for septic arthritis. For induction of the arthritis, mice were administered with an emulsion of *C. albicans* cell wall (CACW) mixed with Complete Freund's Adjuvant (CFA) via footpad-injection (Day 0); PFG at a dose of 0.5 or 1 mg/mouse (25 or 50 mg/kg of body-weight) was given to the animals on Day 3, 6, and 9; footpads were scored for arthritis. Moreover, the PFG effect on proliferation of T-lymphocyte that causes aggravation of arthritis was additionally tested. Data resulting from those tests showed that PFG inhibited the NO production from the stimulated macrophage in a dose dependent manner ($P < 0.05$), indicating that PFG is an anti-inflammatory. To confirm the *in-vitro* results, anti-inflammatory activity of PFG was determined against *C. albicans*-caused septic arthritis. Data showed that PFG-treatment reduced footpad-swelling which indicates that PFG has anti-arthritis effect ($P < 0.05$), which is therapeutic. The anti-arthritis effect appeared to be mediated by PFG suppression of T-cell proliferation. Ultimately, PFG, a monoterpene component, has anti-inflammatory activity analogous to paeoniflorin. The anti-inflammatory activity treats the septic arthritis due to a pathogenic fungus *C. albicans*.

Keywords □ Paeoniae Radix, paeoniflorigenone, paeoniflorin, anti-inflammatory, septic arthritis, *Candida albicans*, macrophage, T-lymphocyte, mice

최근, 전 세계적으로 약용식물의 약물효능에 대하여 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 추세에 따라 본 연구실에서는 생약성분들의 효능에 대하여 다각적인 연구가 진행 중에 있는데, 본 연구에서는 작약 성분의 항염효과를 연구하였다. 작약(*Paeonia lactiflora*, Paeoniaceae)은 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 서식하는 약용식물로 뿌리부위(Paeoniae Radix)를 약용으로 사용하는데, 뿌리는 잘 꺾이지 않고 그 단면은 치밀하다. 이 약용식물은 수백 년 동안 우리나라뿐만 아니라 중국과 일본 등에서 사용되어온 생약재로서, 한방과 전통적인 민간요법에서는 주로

심혈관질환개선과 관절염치료 등에 적용해왔다.^{1,2)} Paeoniae Radix에 함유된 성분분석에 대한 연구보고에 의하면, 작약의 다양한 성분들을 크게 monoterpene glucoside와 monoterpene 두 종류로 구분할 수가 있다. 대표적인 작약성분들을 열거하면, paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, oxybenzoylpaeoniflorin, lactiflorin, galloylpaeoniflorin, paeonin, paeonolide, paeonol, paeoniflorigenone 등으로 대부분의 성분은 monoterpene 배당체이며 이들 성분 중에서 monoterpene 배당체인 paeoniflorin이 작약의 핵심적인 약물학적효과를 나타내는 성분으로 알려져 있다.³⁾ Paeoniflorin의 주요약효는 크게 항염효과(anti-inflammatory effect)와 면역조절작용(immunomodulatory effect)을 손꼽을 수가 있으며, 항염효과에 대한 검색은 주로 관절염발현동물모델을 사용하여 조사한 연구결과가 많이 보고되고

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

있다. 예를 들면, carrageenan, collagen, 또는 adjuvant 유도에 의한 다양한 관절염모델을 통해서 paeoniflorin의 항관절염효과를 규명하였다.^{1,4)} 이 항염효과의 작용기전조사를 위해서 LPS (lipopolysaccharide)로 활성화된 macrophage에서 생성되는 NO (nitric oxide), reactive oxygen species, PGE2(prostaglandin E2) 등의 염증발현물질에 대한 억제효과의 검색이나 cyclooxygenase 효소의 염증활성작용 억제유무를 통해서 규명되었다.^{5,6)} 이와 유사한 방법을 통해서 작용의 또 다른 종류의 monoterpene 배당체 성분의 항염효과를 규명하였다.^{1,2)}

하지만 작용의 monoterpene 배당체 성분인 paeoniflorin과 albiflorin 등의 항염효과에 대한 다양한 연구보고에 비견할 때, 이 monoterpene 배당체들에서 당(glucose)이 없이 그 밖의 화학구조 모핵(moiety)과 매우 유사해서 마치 이들 배당체의 비당부(aglycone)와 같은 작용의 monoterpene 성분의 항염효과에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는, 작용의 monoterpene 배당체인 paeoniflorin의 화학구조와 거의 유사하되 glucose 화학구조가 없는 paeoniflorigenone(PFG)를 선정하여(Fig. 1) 항염효과를 조사하였다. 최근까지 알려진 PFG의 약물효능은 신경근 접합부를 차단하는 항경련작용 효과^{7,8)} 이외에는 특별히 알려진 약물효능이 없다.

PFG의 항염효과를 조사하기 위해서 본 연구실의 기연구에서 고안한 감염성관절염(septic arthritis 또는 infectious arthritis) 동물모델을 사용하였다.^{9,10)} 일반적으로 관절염질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)과 주로 노화에 의한 퇴행성관절염인 골관절염(osteoarthritis)으로 구분한다. 류마티스 관절염 경우에는 감염이 진행되는 동안에 야기되는 일시적 관절염과 항생제 요법에 의해서 감염균이 제거된 후에도 관절염이 지속되는 만성적 경우가 있는데, 후자 형태의 관절염을 특히 감염성관절염이라고 한다. 감염성관절염은 최근에 증가추세에 있으며, 그 이유는 암환자, 당뇨병환자, 간 질환자, 신부전 환자, 저체중 신생아, 장기이식 수술시 면역억제제 사용 경우, AIDS(후천성면역결핍) 환자 등의 증가 때문인 것으로 알려지고 있다.^{11,12)} 본 연구에서 적용한 병원균인 *Candida albicans*는 감염성관절염을 유발하는 병원성 진균 중에서 가장 대표적인 원인균으로,¹²⁻¹⁴⁾ 이 진균에 의한 관절염은 최근에 들어 점차 증가하고 있는 추세이다.^{13,14)}

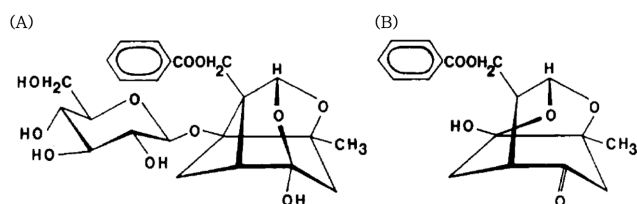


Fig. 1 - The chemical structures of (A) paeoniflorin and (B) paeoniflorigenone (PFG). The PFG consists of an almost identical moiety of paeoniflorin without a glucose portion.

그러므로, 본 연구에서는 PFG의 항염효과 규명과 이 과정을 통해서 PFG의 *C. albicans* 세포벽으로 인한 관절염에 대한 약물효능을 아울러 조사하였다.

재료 및 실험방법

실험동물

본 실험에 사용된 생쥐는 6~7주령의 BALB/c 암컷생쥐(Orient Inc.-Charles River Lab, Seoul)를 사용하였으며, 멸균된 filter-top cage에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 먹게 하였다. 구입한 생쥐는 온도 20±2°C, 습도 50±10%로 유지하고 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절한 동물실 환경에서 사육하며 실험에 사용하였다. 동물관리는 동덕여자대학교 동물관리규정에 따라 취급하였다.

Paeoniflorigenone(PFG)

작용(*Paeonia lactiflora*)의 뿌리에서 분리한 PFG 성분은 김영식 교수(서울대학교 약학대학)로부터 기증을 받아서 본 연구에 사용하였으며, 실험에 사용하기 전에 성분내의 내독소(endotoxin)의 혼재유무를 먼저 확인하고 사용하였다. 내독소 검색은 상업용 테스트 kit(Sigma, St. Louis, MO, US)을 구입하여 조사하였다.

C. albicans 세포벽(CACW)의 분리

CACW의 추출분리는 본 연구실의 기 연구에서 사용된 방법으로,^{15,16)} GYEP(glucose-yeast extract peptone) 액체배지에 배양한 *C. albicans*를 수집하여 disodium EDTA와 trisodium EDTA로 연속 처리한 후에 2-mercaptoethanol로 30분 동안 실온에서 처리하고 상등액을 수집하여 투석막(Sigma, membrane cut-off=12,000 Da)에 넣고 탈 이온수에 대하여 3일 동안 투석하였다. 투석이 완료된 후에 투석막 내부물질을 동결건조(Eyela FD-1000, Tokyo, Japan)하여 분말화 하였고, 분리한 CACW는 desiccator 안에 저장보관하며 본 실험에 사용하였다.

PFG의 nitric oxide(NO) 생성억제 검색

본 연구실의 기 보고에 기술한 실험방법⁹⁾을 사용하여 PFG의 NO생성 억제여부를 검색하였다. 즉, RPMI 1640 배지에 배양한 RAW 264.7 monocyte/macrophage cell line에 일정량의 LPS (lipopolysaccharide; Sigma)와 다양한 농도의 PFG를 각각 투여한 후, 일정시간 동안 세포배양을 지속한 다음에 Griess 시약을 첨가하여 NO 생성 정도를 측정하였다. 이 결과를 LPS만으로 처리한 macrophage(양성대조군)에서 생성하는 NO의 양과 비교하여 PFG의 항염효과 여부를 검색하였다.

CACW 유발성 염증에 대한 PFG의 항염효과 검색

PFG의 항염효과를 확인하기 위하여 본 연구실의 기연구에서

고안한 관절염 동물모델⁹⁾을 사용하여 검색하였다. 이 방법을 요약하면 다음과 같다. 1 ml CFA(Complete Freund's Adjuvant; GibcoBRL, NY, USA)에 1 ml DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline solution; Sigma)에 용해한 CACW(1 mg)을 혼합하고 sonicator로 유회시킨 염증발현물질(CACW/CFA)을 생쥐의 오른쪽 뒷발바닥에 50 µl/mouse 용량으로 피하 주사하여 족부종을 유발시킨 후(0일), 이 생쥐에게 DPBS에 용해한 PFG를 3, 6, 9일째에 총 3회 복강으로 투여하였다. 1회 용량은 0.5 mg/mouse 또는 1 mg/mouse(=app. 50 mg/kg) 농도로 사용하였다. 음성대조군 생쥐에게는 PFG가 첨가되지 않은 DPBS만을 동일한 투여 경로로 생쥐에 투여하였다. 염증(족부종)의 정도는 3일에 한번씩 dial calipers(Mitatoyo Co., IL, USA)로 측정하였다. 각 그룹 생쥐의 수효는 5마리씩 사용하였다. 부종의 억제정도는 [(약물투여군의 일정시간 후의 평균 부종율-대조군의 일정시간후의 평균 부종율)/대조군의 일정시간 후의 평균부종율]×100으로 계산하여 부종억제율(%)로 환산하였다.

PFG의 T-임파구 증식에 대한 효과

일반적인 염증 억제 작용기전은 다양한데, 본 연구에서 선정한 특정 염증으로서 관절염을 선택했기 때문에 PFG의 항관절염 효과의 작용기전 규명의 일환으로서 T-임파구의 증식에 대한 억제효과의 유무를 검색하였다. 이 실험을 위한 방법⁹⁾을 간략하게 기술하면 다음과 같다. 6주령의 Balb/c 암컷생쥐에서 무균조작으로 적출한 비장(spleen)으로부터 splenocyte를 채취하여 RPMI 1640(Sigma) culture medium에 넣고 35°C-CO₂ 배양기에서 24 시간 배양한 splenocytes(5×10⁶ cells/well)에 concanavalin A (Con A; 5 mg/ml; C2010; Sigma)를 투여하고 다양한 농도의 PFG를 첨가한 후, 동일한 배양조건에서 72시간 지속적으로 배양하였다. 72시간 배양 후에 CCK-8(Cell Count Kit-8; Dojindo Lab; Japan)를 투여하고 3시간 더 배양한 후에 T-임파구의 증식 억제 여부를 검색하였다.

통계 처리

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였다. 각 군간의 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하였고 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

NO 생성 억제효과

LPS만으로 처리된 macrophage[대조군(*)]에 비교하면 PFG로 처리된 macrophage에서의 NO 생성은 농도 의존적으로 현저하게 억제되었다(Fig. 2). 일례로, 40 µM PFG의 농도로 처리된 경우에 약 85% 정도의 NO 생성이 억제되었으며, 이 결과를 양성

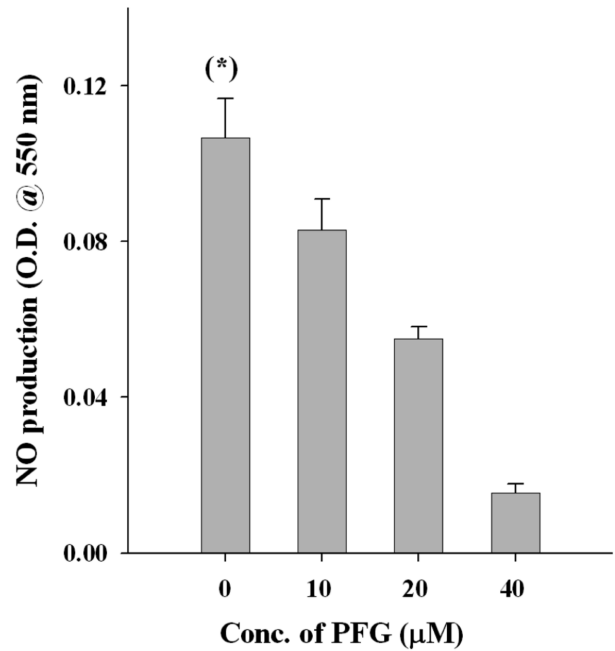


Fig. 2 – PFG inhibits the production of nitric oxide (NO) from LPS-stimulated macrophage. PFG at 40 µM inhibited approximately 90% of the NO production when compared with control (P<0.05). These values were averages of triplicate repeated experiments. Bar indicates S.E.

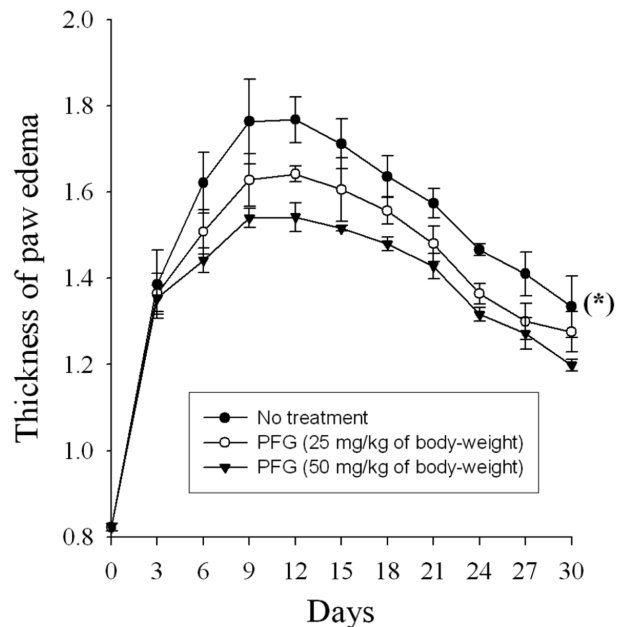


Fig. 3 – PFG has a therapeutic anti-inflammatory effect on the *C. albicans* cell wall (CACW)-caused inflammation in the mouse footpad. The footpad-swelling of the PFG given mice were far less severe than that of the mice that received no PFG. The difference between these two groups was statistically significant (P<0.05). Thickness of the swelling was measured by a dial gauger in arbitrary unit (AU). Each group contained five mice. Bar indicates S.E.

대조군의 경우와 비교하면 통계적으로 매우 유의성이 있었다 ($P < 0.05$) (Fig. 2).

CACW 기인성 관절염증에 대한 치료효과

생쥐에 CACW (*C. albicans* 세포벽)으로 족부종 염증을 먼저 유발시킨 다음에 약물(PFG)을 투여하여 치료효과를 검색한 결과, 이 작용성분을 투여한 생쥐군은 전체적으로 족부종이 감소되었다(Fig. 3). 즉, 족부종의 염증이 가장 절정에 이르는 관측 9일째와 12일째 기간의 족부종을 음성대조군(*)에 비교할 때, 0.5 mg PFG(대략 25 mg/kg) 용량을 투여한 실험군에서는 대략 35% 정도의 족부종의 감소가 있었고, 2배의 PFG 용량을 투여한 경우에는 약 60% 정도의 족부종이 억제되어서 PFG는 CACW 기인성 감염성관절염에 대하여 치료효과가 있으며, 이 효과는 농도의존성을 알 수 있었다($P < 0.05$) (Fig. 3).

T-림파구의 증식(proliferation) 억제효과

T-림파구는 대표적인 염증질환인 관절염을 악화시킨다.^{17,18} PFG의 항관절염증 효과의 작용기전의 일환을 조사하기 위해서, PFG 작용성분의 T-림파구의 증식에 대한 억제 여부를 검색하였다. 이 효과측정을 위해서 T-림파구에 증식효과가 있는 Con A로 처리한 다음에 다양한 농도의 PFG를 첨가한 후 증식억제효과를 측정하였다. 실험결과, PFG는 농도의존적으로 T-림파구의 증식을 억제하였다(Fig. 4). 특히, 40 μ M의 PFG 농도로 처리된

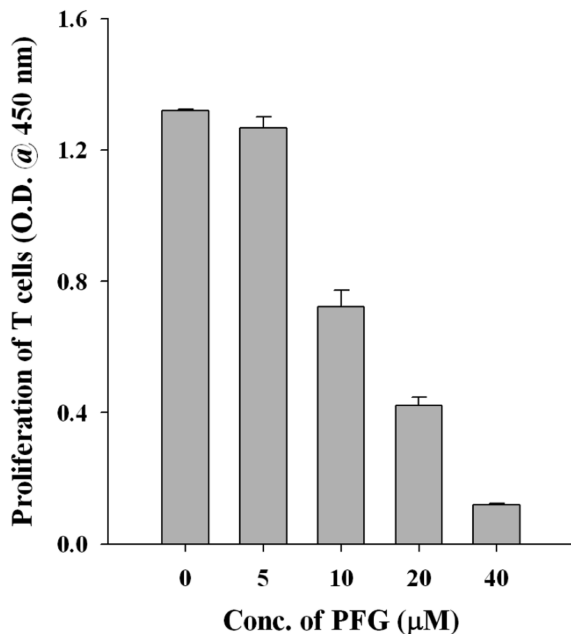


Fig. 4 – PFG blocks the proliferation of T-cells. PFG at a dose of 40 μ M resulted in approximately 90% reduction of the proliferation ($P < 0.05$). In addition, this effect was dose-dependent. These values were averages of triplicate repeated experiments. Bar indicates S.E.

T-림파구의 경우를 대조군[Con A로만 처리된 T-림파구(*)]에 비견해볼 때 90% 이상의 T-림파구 증식억제효과가 있었다($P < 0.05$) (Fig. 4).

고찰

작용성분 중에서 monoterpene glucoside의 일종인 paeoniflorin은 항염효과가 있으며 최근의 연구에 의하면 면역조절효과도 보고되고 있다.^{1,3,5} 하지만 이 성분의 거의 비당부(aglycone)라고 할 수 있는 대표적인 PFG에 대한 약물효능에 대한 연구보고는 매우 미미하며, 특히 PFG의 항염효과에 대해서는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 PFG의 항염효과를 *in-vitro* 상에서 조사하고, 본 실험실에서 고안한 *C. albicans* 기인성 감염성관절염 동물모델을 사용하여 이 성분의 항관절염효과를 최초로 검색하였다. 먼저, PFG의 항염효과를 조사하기 위해서 macrophage가 염증 유발물질에 자극되어 활성화(activation)되면 NO를 생성하는 방법을 응용하여 항염효과를 검색하였다. 즉, LPS로 활성화된 macrophage에 PFG를 투여해서 이 macrophage에서 NO의 생성이 억제되면 항염효과가 있는 것으로 간주하는데, PFG는 NO의 생성을 억제하였고 이 억제효과는 농도 의존적이었다. 이 *in-vitro* 항염효과를 확실히 하기 위해서 감염성관절염 동물모델을 사용하여 PFG의 항관절염효과를 조사하였다. 이 경우에 감염군으로 사용한 병원균은 진균 중에서 가장 빈번한 문제를 야기하는 *C. albicans*를 사용하였다. 이미, 방법 난에서 기술하였듯이, 동물(Balb/c 생쥐)에 족부종 염증을 유발시키기 위해서 *C. albicans* 세포벽물질을 현탁액으로 제조하여 사용하였는데, 이 제조과정에 CFA를 첨가한 까닭은 관절염을 악화시키기 위함이었다.⁹ 이렇게 *C. albicans* 세포벽 기인성 감염성관절염모델을 사용하여 PFG의 항염효과를 검색한 결과, 족부종이 가장 최고조에 달하는 9일에서 12일의 관측기간 동안에 실험군(PFG로 처리된 생쥐 그룹)과 음성대조군(PFG로 처리되지 않은 생쥐그룹)을 상호비교해보면 확연한 족부종의 감소가 있었다. 일례로, 높은 PFG 농도(1 mg/mouse; 50 mg/kg)에서는 거의 60%의 부종감소가 측정되었는데, 이 결과로 PFG가 감염성관절염증에 치료효과가 있음이 확인되었다(Fig. 3 참조바람). 이 시점에서 PFG의 항염효과를 분명히 하기 위해서, 감염성관절염의 치료효과의 작용기전의 작용기전을 검색하였다. 검색방법의 타당성은, 일반적으로 관절염이 유발되면 macrophages가 관절염 발생부위로 유입되어 부종이 형성되고,^{16,19} 자극된 macrophage에서 NO가 생성 분비되어서 주변의 세포와 조직을 파괴하기 때문에 통증이 야기된다.^{20,21} 그러므로, 이미 상기에서 언급하였듯이, PFG의 NO 생성억제효과도 감염성관절염 치료효과의 작용기전으로 관주될 수가 있다. 하지만, 면역학적 측면에서 고찰해 볼 때, CD4+T-림파구가 관절염 발병의 주된 원인이므로 T-림파구 증식의 방해로 인한 T-림파구

의 수효감소는 관절염치료의 한 방법이 될 수 있다. 그래서 임상에서는 이러한 목적을 위해서 anti-CD4 monoclonal antibody를 적용하기도 하다.^{17,19)} 이런 관점에서, PFG의 T-임파구 증식에 대한 억제효과를 검색하였는데, PFG는 Con A로 처리된 T-임파구의 증식을 억제하여서 항염효과를 발현하는 것으로 사료된다.

결 론

결론적으로, PFG는 NO 생성억제와 T-증식억제 등에 의한 항염효과가 있는데, 이 항염효과는 특징적인 염증질환의 일종인 감염성관절염에 치료효과가 있는 것으로 규명되었다. PFG 성분이 *C. albicans* 기인성 관절염치료에 효과 있다는 발견은, 부작용이 많은 기존의 진균 기인성 관절염치료제에 새로운 대안 물질로서 예단해 볼 수가 있다.

현재, 본 실험실에서는 PFG 성분을 나노입자에 부착해서 성분이 가급적 오래 체내에 머물러서 PFG 항관절염 효과를 증대시키기 위한 연구가 진행 중에 있다. 이 나노입자 체형화의 배경은 본 교신저자의 이전의 항원의 면역세포에 지속적 제시를 연구한 결과를¹⁵⁾ 응용한 것으로 일종의 서방형 약물체형의 개발의 초기라고 간주할 수 있겠다.

감사의 말씀

이 논문은 2011년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Zhu, L., Wei, W., Zheng, Y. Q. and Jia, X. Y. : Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis. *Inflamm. Res.* **54**, 211 (2005).
- Koo, Y. K., Kim, J. M., Koo, J. Y., Kang, S. S., Kim, Y. S., Chung, J. H. and Yun-Choi, H. S. : Platelet anti-aggregatory and blood ant-coagulant effects of compounds isolated from *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Pharmazie.* **65**, 624 (2010).
- He, D. Y. and Dai, S. M. : Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Paeonia lactiflora* Pall., a traditional Chinese herbal medicine. *Ethnopharmacology* **2**, 1 (2011).
- Zheng, Y. Q. and Wei, W. : Total glucosides of paeony suppressed adjuvant arthritis in rats and intervening cytokine-signaling between different types of synoviocytes. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1560 (2005).
- Chen, G., Guo, L. X., Deng, X. H., Yin, Z. Y., and Jing, J. J. : Effects of total glucosides of paeony on nitric oxide and inducible nitric oxide synthase production in macrophages and its mechanism. *Zhongguo Mian Yi Xue Za Zhi.* **24**, 345 (2008).
- Liang, J. S., Chen, M. Z. and Xue, S. Y. : Effects of total glucosides of paeony on the function of peritoneal macrophages in rats. *Zhongguo Mian Yi Xue Za Zhi.* **4**, 153 (1990).
- Kimura, M., Kimura, I., Nojima, H., Takahashi, K., Hayashi, T., Shimizu, M. and Morita, N. : Blocking effects of a new component, paeoniflorigenone, in paeony root on neuromuscular junctions of frogs and mice. *Japan. J. Pharmacol.* **35**, 61 (1984).
- Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kimura, I., Kimura, M., Kiuch, F., Noguchi, H., Itaka, Y. and Sankawa, U. : Paeoniflorigenone, a new monoterpene from paeony roots. *Tetrahedron Lett.* **22**, 3069 (1981).
- Han Y. : Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1049 (2005).
- Han, Y. : Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 207 (2009).
- Miceli, M. H., Daz, J. A. and Lee, S. A. : Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 142-51 (2011).
- Cuende, E., Barbadillo, C. E., Mazzucchelli, R., Isasi, C., Trujillo, A. and Andreu, J. L. : Candida arthritis in adult patients who are not intravenous drug addicts: report of three cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* **22**, 224 (1993).
- Lerch, K., Kalteis, T., Schubert, T., Lehn, N. and Grifka, J. : Prosthetic joint infection with osteomyelitis due to *Candida albicans*. *Mycoses.* **46**, 462 (2003).
- Azaceta, G., Olave, T., de los Martires, L. D., Delgado, C., Gutierrez, M. and Palomera, L. : Successful lipid-complexed amphotericin B treatment of *Candida* arthritis in a lymphoma patient. *Rev. Rhum. Eng.* **66**, 434 (1999).
- Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun.* **63**, 2714 (1995).
- Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
- Pohlers, D., Nissler, K., Frey, O., Simon, J., Petrow, P. K., Kinne, R. W. and Brauer, R. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin. Exp. Immunol.* **135**, 409 (2004).
- Nissler, K., Pohlers, D., Hckel, M., Simon, J., Brauer, R. and Kinne, R. W. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 1470 (2004).
- Nissler, K., Pohlers, D., Huckel, M., Simon, J., Brauer, R. and

- Kinne, R. W. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 1470 (2004).
- 20) Kinne, R. W., Brauer, R., Stuhlmuller, B., Palombo-kinne, E. and Burmester, G. R. : Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2**, 189 (2000).
- 21) Lotito, A. P., Muscara, M. N., Kiss, M. H., Teixeira, S. A., Novaes, G. S., Laurindo, I. M., Silva, C. A. and Mello, S. B. : Nitric oxide-derived species in synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol.* **31**, 992 (2004).