桂芍知母加牛膝湯 약침이 류마티스 관절염 생쥐에 미치는 영향

정순현[1] · 조종관[2] · 김소연[3] · 김영일[3] *

A Study on the Effect and Mechanism of Gamikyejakjimogawusul-tang Herbal Acupuncture on Induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice

Soon Hyun Jung[1] · Chong kwan Cho[2] ·So Yun Kim[3] · Young Il Kim[3] *
[1]Dept. of Oriental Internal Medicine, Graduate school of Korean Medicine, Daejeon University
[2]East West Cancer Center, Dunsan Korean Medical Hospital of Daejeon University
[3]Dept. of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives : The purpose of this study is to prove the effect and mechanism of Gamikyejakjimogawusul-tang(GKHA) herbal acupuncture on induced rheumatoid arthritis model of DBA/1 mice.

Methods : We check effect of GKHA extract on the AST, ALT, Creatinine, BUN of serum and cell viability of GK extract in RAW 264.7 cells to test the stability of this study.

In vitro, we measure total phenol contents, total flavonoid contents, DPPH free radical scavenging activity, ABTS cation radical scavenging activity of Gamikyejakjimogawusul-tang, effect of GK extract on ROS(Reactive Ooxygen Species) production to estimate a anti-oxidant capacity, and we also measure effect of GK extract on NO (Nitric Oxid), IL-1β, IL-6, IL-17, IL-21, TNF-α, MCP-1, GM-CSF production in RAW 264.7 cells to estimate a anti-inflammatory efficacy.

In vivo, we compare a rheumatoid arthritis manifestation between control and experimental group and estimate a AI. Then we check effect of GKHA on the level of WBC, neutrophil, lympocyte, monocyte in the blood to see the effect of immune cells in blood. In addition we measure effect of GKHA on the level of hs-CRP, IgM, IgG, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-21, TNF-α, MCP-1, GM-CSF in serum.

We observe effects of GKHA on imaging of cartilage degeneration using micro CT-arthrography in paw hind. And we calculate effects of GKHA that reduced BV ratio, BS/BV ratio using 3D Micro-CT. Lastly we observe effects of GKHA histopathologic examination analysis.

Results : 1. The toxicity on liver and kidney was disregardable and the cytotoxicity against RAW 264.7 cells was also disregardable.

<In vitro>

1. Total phenol contents and total flavonoid contents in GK extract were in high level.

2. DPPH free radical scavenging activity and ABTS cation radical scavenging activity were increased according to concentration of GK extract

3. ROS production was significantly decreased in GK extract (at 10, 100 ㎍/ml).

4. NO, IL-6, TNF-α, MCP-1 production were significantly decreased in GK extract(at 10, 100 ㎍/ml). IL-17, GM-CSF production were significantly decreased in GK extract(at 1, 10, 100 ㎍/ml). IL-1β, IL-21 production were also decreased but there was no statistical significance.

5. 25x observation after H&E and M-T staining, infiltration of immune cells and subsidence of the cartilage and damage to the synovial cells were decreased.

Conclusions : This study showed that GKHA extract had anti-oxidant capacity, anti-inflammatory efficacy. GKHA extract also had inhibiting effect on the process of rheumatoid arthritis and can protect joint and cartilage. So we expect that GKHA extract can be a meaningful treatment to rheumatoid arthritis patients.

Key Words : Gamikyejakjimogawusul-tang (GK), Gamikyejakjimogawusul-tang Herbal Acupuncture (GKHA), Phamacopuncture, Rheumatoid arthritis, Anti-oxidant capacity, Anti-inflammatory effect

Running title : Gamikyejakjimogawusul-tang Herbal Acupuncture on Rheumatoid Arthritis Mice

Ⅰ. 서 론

류마티스 관절염은 관절 내 대식세포 및 T 세포 등 염증세포의 침윤 및 활막의 이상증식을 특징으로 하는 전신질환으로, 분비되는 염증성 사이토카인들이 중요한 인자로 작용하여 관절의 변형이 유발된다.[1] 일반적으로 인구의 1%가 류마티스 관절염에 이환되고, 여성이 남성에 비해 2.5배 높은 발병률을 가지며, 40대에서 70대 사이의 연령대에 가장 흔하며 발병률은 연령에 따라 증가하는 것으로 되어있다.[2]

서양의학에서는 류마티스 관절염의 원인으로 IgG에 대한 자가 항체인 류마티스 인자(Rheumotoid Factor, RF)와 항CCP 항체가 류마티스 관절염의 진단과 병인에 중요하다고 알려져 있다. 또한 fibroblast, CD8+와 CD4+ T세포, macrophage, mast cell, dendritic cell, B세포의 중요성이 새롭게 알려지게 되었다. 특히 과거에는 CD4+ T세포의 아형 중 Th1세포가 류마티스 관절염 초기 병인에 중요한 역할을 한다고 생각되었으나, 이후에는 Th17세포가 병인의 핵심 역할을 하여 이와 관련된 IL-17, IL-21, IL-6, TNF-α 등의 역할이 질병에 중요한 원인으로 인정되고 있다.[3]

서양의학에서는 류마티스 관절염 치료제로 aspirin, NSAID, 부신피질호르몬, DMARD, 항TNF-α제제, 면역억제제 등이 사용되고 있으나 여러 심각한 부작용이 발생하는 경우가 많아 보다 효과적이며 안전성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.[4]

류마티스 관절염의 증상으로 볼 때 한의학에서는 이를 痺症과 歷節風의 범주에 포함시킬 수 있는데 痺症은 肢體, 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障碍 등의 증상을 보이며[5], 歷節風은 관절이 붓고 심한 疼痛을 호소하며 관절이 屈伸不利하는 것을 특징으로 하는 병으로 紅腫, 下肢腫痛, 脚腫如脫, 手指變曲, 夜間痛甚 등의 증상이 나타난다.[6] 食傷, 勞倦, 痰飮, 瘀血에 의해 氣血이 부족해지고 精氣가 허약해진 상태에서 風寒濕熱邪가 침입하여 발생하기 때문에 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝하는 치법을 사용한다.[7]

본 연구에 사용된 桂芍知母湯은 『金匱要略』[8]에서 祛風散寒除濕하고 淸熱한다하여 歷節風에 사용한 처방[9]으로, 김 등[10]의 연구에서는 桂芍知母湯이 혈액학적으로 소염, 진통작용이 있음을 보고하였고, 홍 등[11]의 연구에서는 桂芍知母湯加味方을 경구 투여하여 골관절염에 조직면역학적으로 어떠한 영향을 미치는지에 대해 보고하였으나 약침의 형태 연구는 없었다.

이에 저자는 桂芍知母湯에 기존 연구에서 골관절염에 효과가 있다고 증명된 牛膝[12-14]을 加한 桂芍知母牛膝湯의 약침 투여가 류마티스 관절염에 효과가 있는지를 규명하고자 In vitro에서 桂

* 교신저자 : 김영일. 대전광역시 서구 대덕대로 176번길 75 대전대학교 부속 둔산한방병원 침구의학과
E-mail : omdkim01@dju.kr ·Tel : +82-42-470-9137
투고일 : 2016년01월13일 수정일 : 2016년01월26일
게재일 : 2016년02월03일

芍知母加牛膝湯 추출액의 항산화효능과 NO 및 IL-1β, IL-17, TNF-α 등의 사이토카인과 케모카인의 생성량을 측정하여 항염증효능을 측정하였고, 3D μCT를 통한 관절 상태, 골밀도, 관절염증 정도 측정과 병리조직학적 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 桂芍知母加牛膝湯(Gamikyejakjimogawusul-tang 이하, GK로 표기)의 구성 약재들은 ㈜옴니허브에서 구입하였고 대전대학교 TBRC-RIC에서 구입하여 정선 후 사용하였고, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

3) 동물 및 사료

실험동물인 수컷 5주령의 DBA/1 생쥐 (16~22 g)는 ㈜중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (㈜퓨리나)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대 동물실험윤리 위원회의 승인(승인번호-DJUARB 204-014)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

4) 시약

사용된 시약은 isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), gelred (Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.),

Table 1. The prescription of GK

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
白 朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	12
牛 膝	*Achyranthis Radix*	12
桂 枝	*Cinnamomi Ramulus*	9
芍 藥	*Paeoniae Radix*	9
知 母	*Anemarrhenae Rhizoma*	9
防 風	*Saposhnikoviae Radix*	9
麻 黃	*Ephedrae Herba*	9
枳 實	*Poncirus trifoliata Rafin*	9
乾 薑	*Zingiberis Rhizoma*	9
甘 草	*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*	9
附 子	*Aconiti Lateralis Radix Preparata*	8
Total amount		104

lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), agarose (FMC Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescin diacettate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), Immunization Grade Bovine Type II Collagen, Solution (Chondrex Co., U.S.A), Incomplete Freund's Adjuvant (Chondrex Co., U.S.A), complete Freund's Adjuvant (Chondrex Co., U.S.A), ethanol (Merck Co., Germany), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Indomethacin (Sigma Co., U.S.A.), IL-17AF ELISA Kit (eBioscience Co., U.S.A.), IL-21 ELISA Kit (eBioscience Co., U.S.A.), MCP-1 ELISA Kit (eBioscience Co., U.S.A.), GM-CSF ELISA Kit (eBioscience Co., U.S.A.), Mouse IgM ELISA kit (eBioscience Co., U.S.A.),, Mouse IgG ELISA kit (eBioscience Co., U.S.A.), total RNA prep kit (Intronbio., Korea), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck., Germany), Gallic acid (Sigma Co., U.S.A), Quercertin (Sigma., U.S.A), Sodium carbonate (Sigma., U.S.A), Aluminum nitrate nonahydrate (Sigma Co., U.S.A), Potassium acetate solution (Sigma Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

5) 기기

사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadizu Co., Japan), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany), Fusion-SL(Vilber Lourmat., Deutschland) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

GK 1첩에 80% 주정(C2H5OH) 1200 ml을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 14.3 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 약침액의 제조

분쇄기를 이용하여 GK 104 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 환류추출 후, 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압 농축하였다. 농축액에 90% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여 침전물이 생성되게 한 다음 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 80% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 70% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후

방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. GK에서 얻은 약침액을 감압 농축하여 수분을 모두 날려 얻은 분말을 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filtering하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 桂芍知母加牛膝湯藥鍼(Gamikyejakjimogawusul-tang Herbal Acupuncture 이하, GKHA로 표기)으로 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 간 기능

혈청 내에서 AST, ALT 활성도를 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 서울의과학연구소 (Seoul, Korea)에 분석 의뢰 하였다. AST, ALT 활성도는 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

(2) 신 기능

혈청 내에서 creatinine, BUN 활성도를 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 서울의과학연구소 (Seoul, Korea)에 분석 의뢰 하였다. Creatinine의 함량은 Creatinine Jaffe Method 의 원리, BUN의 함량은 Kinetic UV assay for urea/urea nitrogen의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다

(3) 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, GK를 각각 1, 10, 100 ㎍/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 ㎕의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 ㎚에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

3. *In vitro*

1) RAW 264.7 cell 배양

동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상청액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 100 ㎜ dish에 9 ml의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

2) 항산화 효능 측정

(1) 총 phenol 함량 측정

GK 추출물의 phenol 함량은 Gutfinger의 방법[15]을 응용하여 측정하였다. 추출 시료용액 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 mL와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 phenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 gallic acid equivalent (GAE)/g을 사용하였다.

(2) 총 flavonoid 함량 측정

GK 추출물의 flavonoid 함량은 Nieva Moreno 등의 방법[16]을 응용하여 측정하였다. 각 샘플 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate와 1M potassium acetate 0.1 ml 그리고 80% 에탄올

4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

(3) DPPH radical 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법이다. GK 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ㎍/ml의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ㎕와 GKHA 추출물을 각각 100 ㎕씩 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(4) ABTS radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. GK 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ㎍/ml의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS·+)을 형성시킨 다음 734 ㎚에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS·+ 용액 150 ㎕와 GKHA 추출물을 각각 5 ㎕ 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{(시료 첨가군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(5) 세포내 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성 측정

RAW 264.7 세포에서 ROS를 측정하기 위하여 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, GK 추출물을 1, 10, 100 ㎍/ml의 농도로 처리하고, LPS 1 ㎍/ml의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA은 10 μM이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 ㎕를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

3) 항염증 효능 측정

(1) Nitric Oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 NO 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 GK 추출물을 각각 1, 10, 100㎍/ml의 농도와 LPS 1 ㎍/ml의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(2) 사이토카인 및 케모카인 생성량 측정

세포 내에서 염증성 사이토카인을 12 well

plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, GK 추출물을 1, 10, 100㎍/ml의 농도로 처리하고, LPS 1 ㎍/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1β, IL-6, TNF-α는 Luminex를 이용하여 측정하였으며, IL-17, IL-21, MCP-1, GM-CSF는 ELISA Reader기를 이용하여 측정하였다.

4. 방사선 검사 및 Structural Parameter 측정

5주간 실험 종료 후 동물을 희생하여 각 그룹별로 후족부를 분리하였다. 분리한 후족부의 시편을 사후 경직이 일어나기 전 최대한 발가락을 편 후, 10% 포름알데히드 용액에 고정한 뒤 ㈜라온바이오 (Gyeonggi-do, Korea)에 Micro-CT 촬영 및 Structural Parameter를 의뢰하였다. Micro-CT 촬영은 후족부 전체를 촬영한 후 3D 작업을 실시하였으며, Structural Parameter 측정은 가운데 발가락을 기준으로 BV (bone volume)와 BS (bone surface)에 대한 ratio를 산출하여 관절의 염증정도를 나타내었다.

5. 조직 염색 관찰

에틸에테르(C2H5OC2H5)로 마취하여 후족부를 잘라내어 각 실험군 별로 적출한 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 고정이 완료된 조직들을 흐르는 수돗물에서 12시간 수세한 뒤 조직 내의 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블럭을 제작하였다. 제작된 블럭은 박편절단기(microtome)를 이용해 3~4 ㎛ 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 다음 hematoxyline과 eosin (H&E) 염색과 masson trichrome stain 염색을 각각 실시하여 광학현미경상에서 25x로 관찰 및 사진 촬영 하였다(Fig. 1).

FIXATION	10% Neutral Formalin	48 hrs
	⬇ Washing	Tab water, 12 hrs
DEHYDRATION	60%, 70%, 80%, 90%, 100% Ethyl Alcohol	1 to 2 hrs, each
	⬇	
CLEARING	Xylene	1 to 2 hrs, each, 2 times
	⬇	
INFILTRATION	Xylene : Paraffin, Paraffin	2 hrs, soft and hard each,
	⬇	
EMBEDDING	Paraffin Wax	
	⬇	
SECTION	Microtome	3-4 ㎛
	⬇	
STAIN	Hematoxylin & Eosin masson trichrome	Hematoxylin : 5 mins Eosin : 1min masson trichrome : 5 min
	OBSERVATION	

Fig. 1. Tissue Preparation Processing.

6. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 student's t-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 안전성 검사

1) 간 기능에 미치는 영향

(1) AST (Aspartate Aminotransferase)

간 기능 측정의 지표 성분인 AST를 측정한 결과, 정상군은 135.0±21.2 U/L, 대조군은 192.0±13.3 U/L, 양성 대조군은 114.0±26.2 U/L, GKHA 군은 105.0±12.7 U/L로 나타나, 정상군과 비교하여 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 2).

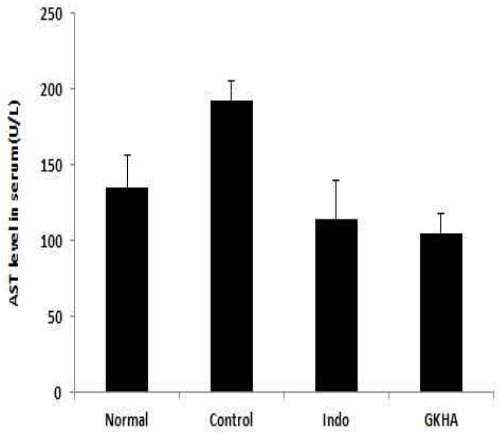

Fig. 2. Effect of GKHA extract on the AST of serum in CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. DBA/1 mice model followed by the administration of GKHA for 5 weeks. The results were presented by the mean ± S.D.

(2) ALT (Alanine Transaminase)U/L, 대조군은 63.0±4.2 U/L, 양성 대조군은 24.0±10.3 U/L, GKHA 군은 28.0±6.9 U/L로 나타나, 정상군에 비하여 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 3).

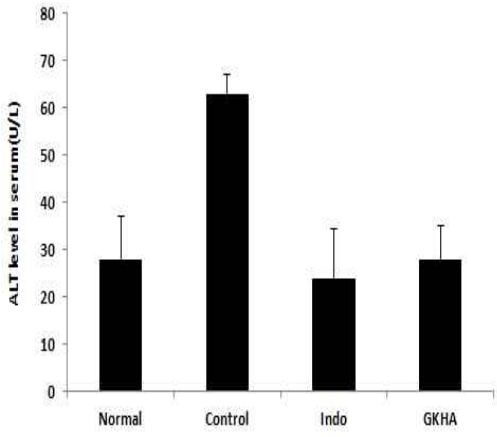

Fig. 3. Effect of GKHA extract on the ALT of serum in CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. DBA/1 mice model followed by the administration of GKHA for 5 weeks. The result were presented by the mean ± S.D.

2) 신 기능에 미치는 영향

(1) Cr (Creatinine)

신 기능 측정의 지표 성분인 creatinine 농도를 측정한 결과, 정상군은 1.6±0.3 (㎎/㎗), 대조군은 1.2±0.6 (㎎/㎗), 양성 대조군은 1.6±0.3 (㎎/㎗), GKHA 군은 1.4±0.7 (㎎/㎗)로 나타나, 정상군에 비하여 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 4).

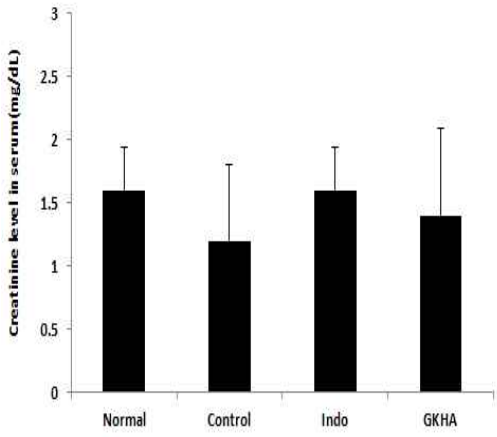

Fig. 4. Effect of GKHA extract on the creatinine of serum in CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. DBA/1 mice model followed by the administration of GKHA for 5 weeks. The result were presented by the mean ± S.D.

(2) BUN (Blood Urea Nitrogen)

신 기능 측정의 지표 성분인 BUN 농도를 측정한 결과, 정상군은 30.0±3.3 ㎎/dℓ, 대조군은 36.0±2.7 ㎎/dℓ, 양성 대조군은 26.0±4.8 ㎎/dℓ, GKHA 군은 32.0±2.7 ㎎/dℓ로 나타나, 정상군에 비하여 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 5).

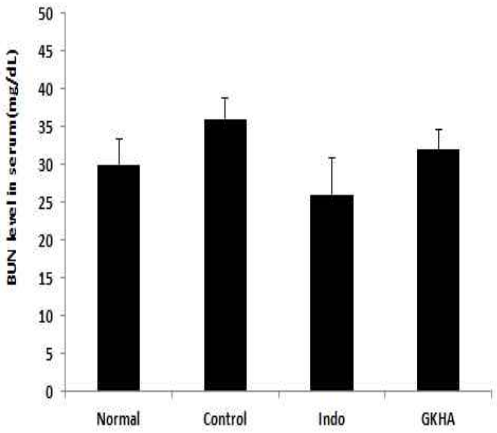

Fig. 5. Effect of GKHA extract on the BUN of serum in CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. DBA/1 mice model followed by the administration of GKHA for 5 weeks. The result were presented by the mean ± S.D.

3) 세포 독성

RAW 264.7 세포에서 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 GK 추출물의 1, 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 110.7±4.8%, 108.1±1.6%, 101.8±3.7%의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 나타났다(Fig. 6).

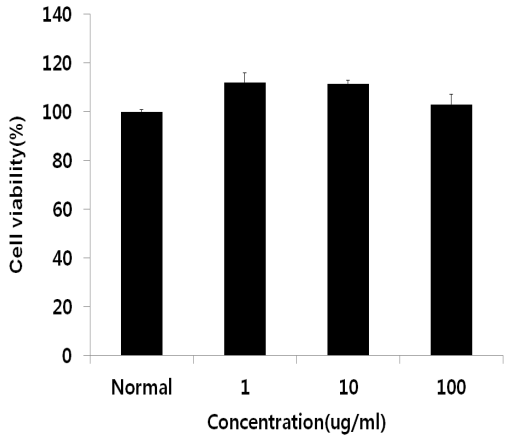

Fig. 6. Cell viability of GK extract in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

2. *In vitro*

1) 항산화 효능에 미치는 영향

(1) 총 phenol 함량

GK 추출물에 존재하는 총 phenol 함량을 gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과, Table 4와 같이 phenol 함량이 235.60±1.28 ㎎/g으로 나타났다.

Table 4. Total phenol contents of GK

Sample	Total phenolics (㎎/g ext.)
GK	235.60 ± 1.28

(2) 총 flavonoid 함량

GK 추출물에 존재하는 총 flavonoid 함량을 gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과, Table 5와 같이 flavonoid 함량이 46.15±1.70 ㎎/g으로 나타났다.

Table 5. Total flavonoid contents of GK

Sample	Total flavonoid (㎎/g ext.)
GK	46.15 ± 1.70

(3) DPPH radical 소거능에 미치는 영향

GK 추출물의 DPPH 소거율을 측정한 결과, 1 ㎍/ml 농도에서 8.70±0.6%, 10 ㎍/ml 농도에서 13.9±1.0%, 100 ㎍/ml 농도에서 31.5±1.7%, 1,000 ㎍/ml 농도에서 80.8±2.0% 로 나타나 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가함을 보였다 (Fig. 7).

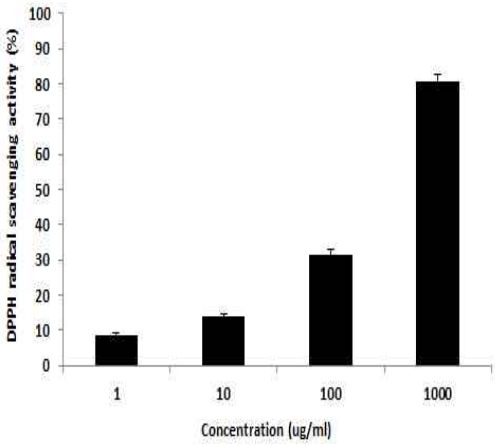

Fig. 7. DPPH free radical scavenging activity of GK extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37℃ for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 ㎚. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

(4) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

GK 추출물의 ABTS 소거율을 측정한 결과, 1 ㎍/ml 농도에서 0.1±0.8%, 10 ㎍/ml 농도에서 2.3±0.1%, 100 ㎍/ml 농도에서 29.9±1.1%, 1,000 ㎍/ml 농도에서 91.7±0.1% 로 나타나 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가함을 보였다 (Fig. 8).

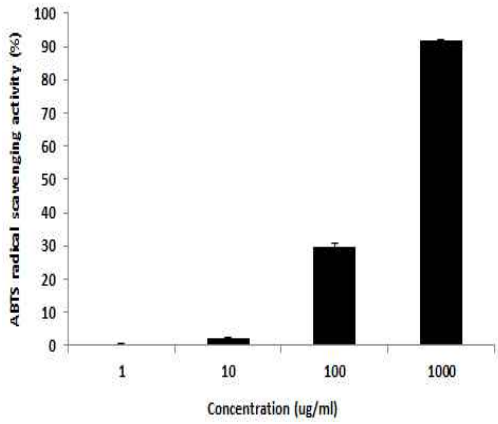

Fig. 8. ABTS cation radical scavenging activity of GK extract at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37℃ for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 ㎚. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

(5) ROS 생성량에 미치는 영향

GK 추출물의 ROS 생성 저해 활성을 측정한 결과, 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 정상군은 58.7±2.7%, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 94.4±5.1%, 10 ㎍/ml 농도에서 81.4±3.8%, 100 ㎍/ml 농도에서 80.8±2.8%로 나타나, 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있는 (** $p<0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 9).

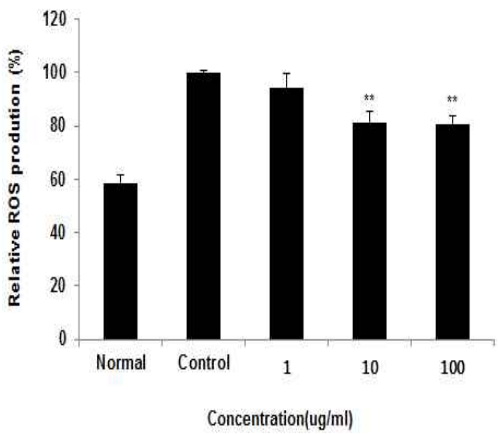

Fig. 9. Effect of GK extract on ROS production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract and LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, ** : $p<0.01$).

2) 항염증 효능에 미치는 영향

(1) NO의 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0±3.7%로 나타냈을 때 정상군은 35.2±6.1%, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 99.2±7.7%, 10 ㎍/ml 농도에서 91.0±4.4%, 100 ㎍/ml 농도에서 82.4±4.5%로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있는 (** : p<0.01, * : p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 10).

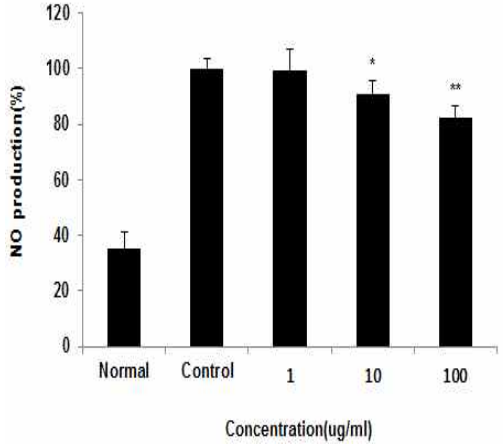

Fig. 10. Effect of GK extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract and LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, ** : $p<0.01$, * : $p<0.05$).

(2) 사이토카인 및 케모카인에 미치는 영향

① IL-1β에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 대조군이 11.3±2.5 pg/ml, 정상군이 8.7±0.5 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 10.4±2.8 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 7.8±2.3 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 6.3±0.8 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Fig. 11).

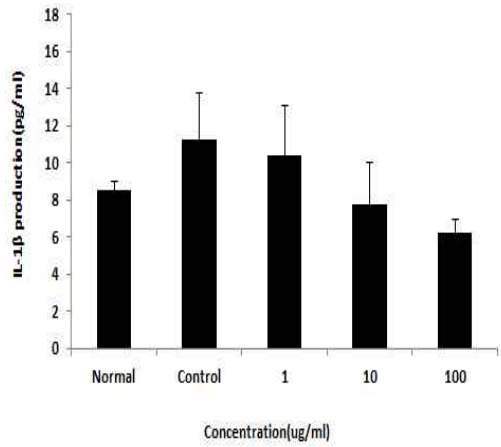

Fig. 11. Effect of GK extract on LPS-induced IL-1β production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

② IL-6에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군이 4347.0±233.4 pg/ml, 정상군이 31.5±5.5 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 3151.8±578.3 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 2096.5±130.0 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 1137.5±173.5 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 (** : p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 12).

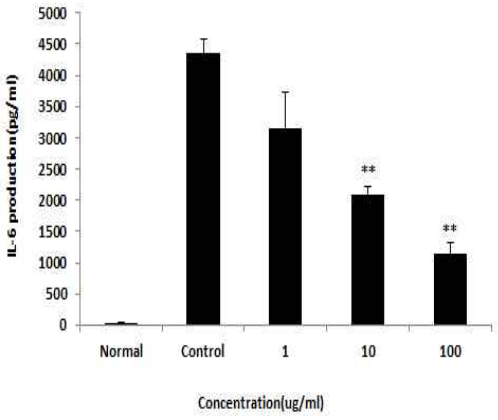

Fig. 12. Effect of GK extract on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results, ** : p<0.01).

③ IL-17에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 IL-17 생성량을 측정한 결과, 대조군이 20.7±2.6 pg/ml, 정상군이 4.7±0.9 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 13.9±1.1 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 12.4±3.0 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 13.1±1.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (* : p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 13).

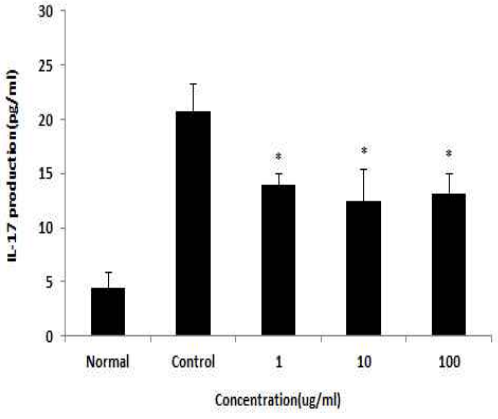

Fig. 13. Effect of GK extract on LPS-induced IL-17 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, * : p<0.05).

④ IL-21에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 IL-21 생성량을 측정한 결과, 대조군이 0.7±0.1 pg/ml, 정상군이 0.3±0.1 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 0.2±0.1 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 0.3±0.1 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 0.2±0.1 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 감소를 나타내었다(Fig. 14).

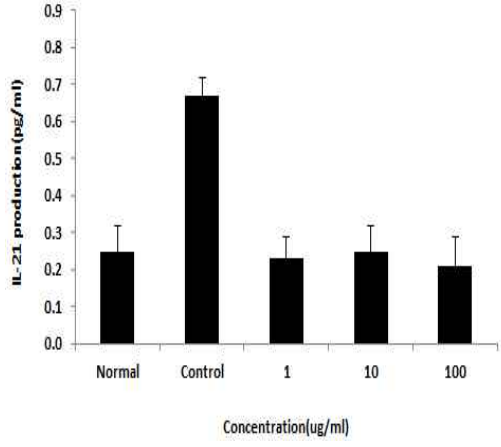

Fig. 14. Effect of GK extract on LPS-induced IL-21 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

⑤ TNF-α에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 대조군이 5449.8±466.2 pg/ml, 정상군이 2923.8±104.4 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 4190.5±543.9 pg/ml,

10 ㎍/ml 농도에서 3966.6±502.4 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 3653.5±518.1 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 (* : p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 15).

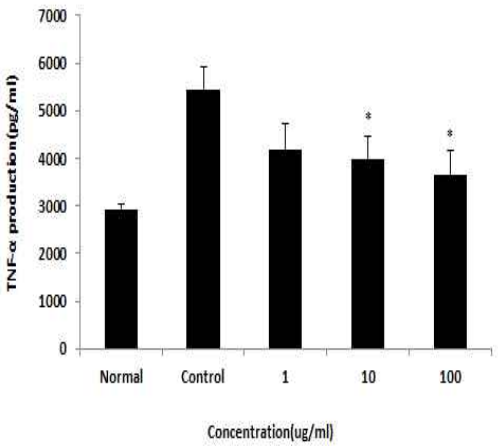

Fig. 15. Effect of GK extract on LPS-induced TNF-α production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, * : p<0.05).

⑥ MCP-1에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 MCP-1 생성량을 측정한 결과, 대조군이 507.7±59.1 pg/ml, 정상군이 203.7±47.3 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 387.0±58.8 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 323.9±60.1 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 241.1±43.2 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 (** : p<0.01, * : p<0.05) 감소를 나타내었다 (Fig. 16).

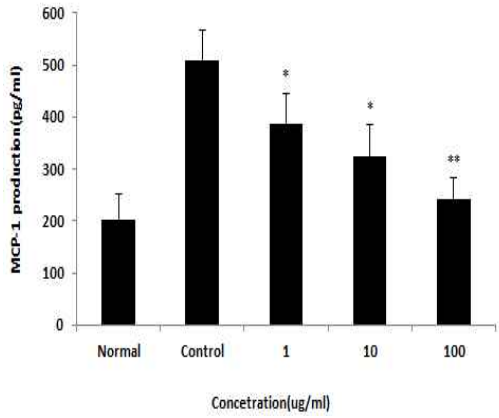

Fig. 16. Effect of GK extract on LPS-induced MCP-1 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, ** : p<0.01, * : p<0.05).

⑦ GM-CSF에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 GK 추출물의 GM-CSF 생성량을 측정한 결과, 대조군이 70.2±6.6 pg/ml, 정상군이 23.9±5.4 pg/ml, GK 추출물은 1 ㎍/ml 농도에서 22.8±3.8 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 24.1±4.2 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 24.3±5.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 (** : p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 17).

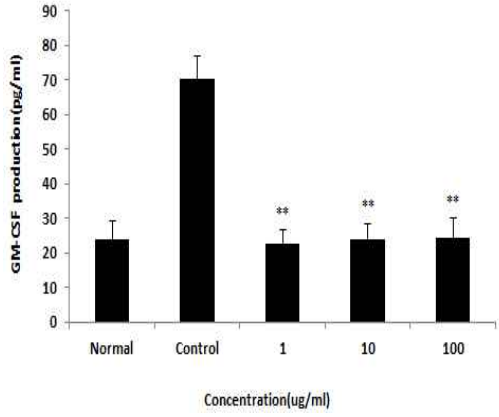

Fig. 17. Effect of GK extract on LPS-induced GM-CSF production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/ml) of GK extract in the presence of LPS (1 ㎍/ml) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments(Significance of results, ** : p<0.01).

3. 관절에 미치는 영향

1) 관절 상태에 미치는 영향

실험 종료 후 후족부를 micro-CT로 촬영하여 3D로 변환한 결과, 대조군에서는 정상군에 비하여 관절의 변형 및 파괴가 크게 일어났으나(Fig. 41-A, B 사각형), GKHA 군에서는 양성 대조군과 더불어 관절의 변형 및 파괴가 적게 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 41-C, D 사각형).

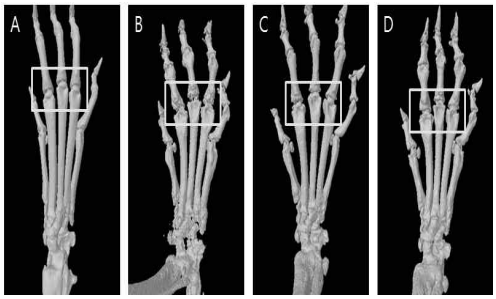

Fig. 18. Effects of GKHA on imaging of cartilage degeneration using micro CT-arthrography in paw hind of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice.
A ; Normal mice group
B ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group
C ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group treated with Indomethacin
D ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group treated with GKHA

2) 골밀도에 미치는 영향

실험 종료 후 후족부를 3D μCT로 분석하여 BV(bone volume)에 대한 ratio를 산출하여 골밀도를 측정한 결과, 정상군은 0.36±0.03 (U^3), 대조군은 0.21±0.05 (U^3), 양성 대조군은 0.37±0.10 (U^3), GKHA 군은 0.37±0.01 (U^3)로 나타나, 대조군에 비하여 증가를 나타내었다(Fig. 42).

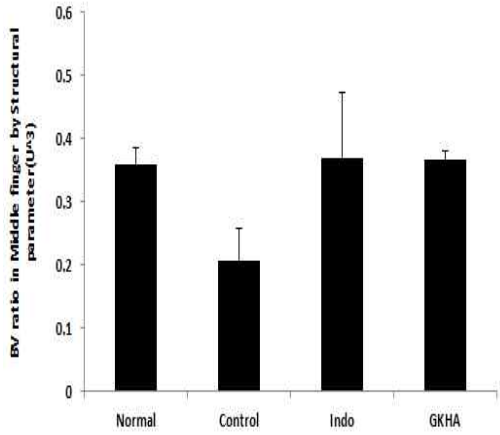

Fig. 19. Effects of GKHA that reduced BV (bone volume) ratio using 3D Micro-CT of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean ± S.D.

3) 관절 염증에 미치는 영향

실험 종료 후 후족부를 3D μCT로 분석하여 BS(bone surface)와 BV(bone volume)에 대한 ratio를 산출하여 관절의 염증정도를 측정한 결과, 정상군은 17.10±0.5 (1/U), 대조군은 26.9±4.7 (1/U), 양성 대조군은 17.0±1.7 (1/U), GKHA 군은 18.0±0.7 (1/U)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는 (** : p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 43).

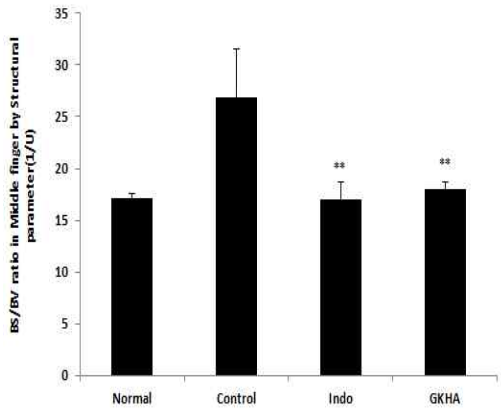

Fig. 20. Effects of GKHA that reduced BS (bone surface) / BV (bone volume) ratio using 3D Micro-CT of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's *t-test*(Significance of results, ** : $p<0.01$).

4. 조직 변화에 미치는 영향

생쥐의 후족부에서 H&E와 M-T 염색을 하여 25x로 측정한 결과, 대조군은 면역세포의 침투와 연골의 침하 및 활막세포의 손상이 심하게 일어난 반면, GKHA 군은 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 44).

Ⅳ. 고 찰

류마티스 관절염은 여러 관절의 활막에 발생하는 만성 염증으로 인해 연골의 파괴와 골미란을 일으키고 결국 관절의 변형을 초래하게 되는 원인 불명의 자가면역질환이다.[17, 18]

일반적으로 전 세계 인구의 1%가 류마티스 관절염에 이환되고, 여성이 남성에 비해 2.5배 높은 유병율을 나타내지만 나이가 들어감에 따라 남녀의 차이는 감소하는 것으로 알려져 있고 모든 연령대에 발병할 수 있으나 40대에서 70대 사이의 연령대에 가장 흔하며 발병율은 연령에

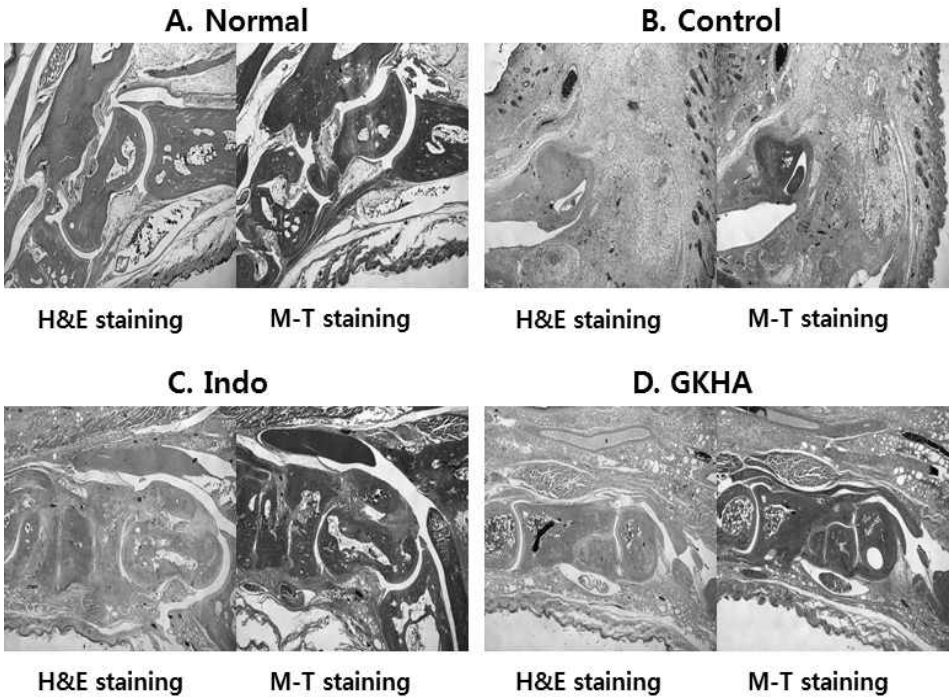

Fig. 21. Effects of GKHA histopathologic examination analysis of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice.

A ; Normal mice group
B ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group
C ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group treated with Indomethacin
D ; CIA-induced Rheumatoid Arthritis group treated with GKHA

따라 증가한다.[2, 17)]

류마티스 관절염의 증상으로 볼 때 한의학에서는 이를 肢體, 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障碍 등의 증상을 보이는 痺症과 관절이 붓고 심한 疼痛을 호소하며 관절이 屈伸不利하는 것을 특징으로 하며 紅腫, 下肢腫痛, 脚腫如脫, 手指變曲, 夜間痛甚 등의 증상을 보이는 歷節風의 범주에 포함시킬 수 있다.[5, 6)]

痺證은 病因에 따라 風痺, 寒痺, 濕痺, 熱痺로 분류하고, 病邪의 特性에 따라 行痺, 着痺, 痛痺로도 분류되며, 發病部位에 따라서는 皮痺, 脈痺, 肌痺, 肉痺, 筋痺, 血痺, 骨痺로도 분류된다. 內濕과 外濕으로 分類하여 風濕, 痛風, 歷節風으로도 불리며, 發病樣相 및 病症에 따라 周痺, 衆痺 등으로도 分類하고 五臟의 이름을 따서 명명한 경우도 있다.[9)]

≪素門·痺論≫[20)]에 "風寒濕 三氣 雜至 合以爲痺也"라고 처음 기재된 이래 歷節風, 白虎病, 痛風, 白虎歷節風, 鶴膝風 등으로도 지칭되고 있고, 風의 성질이 善行而數變하여 疼痛이 遊走하므로 行痺라 칭하여 外邪중 특히 風邪의 침범과 밀접한 관계가 있으며, 음식과 생활환경과도 관계가 있음을 말하여 소위 "飮食起居爲其病本"이라 하였다.[4, 21)] 이렇게 痺證은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 腠理空疎혹은 精氣虛弱한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 관절에 凝滯됨으로써 血氣運行을 저해하여 발병한다고 보았다.[22)]

류마티스 관절염의 한의학적 치법은 風寒濕 각 邪氣와 병리변화로 인한 熱邪, 痰濁, 瘀血과 寒熱虛實을 辨證하여 祛風散寒, 溫通經脈, 淸熱除濕, 活血和瘀, 祛痰, 補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝 등의 治法이 사용된다.[23-25)]

대표적인 자가면역성 질환인 류마티스 관절염의 증상은 발병초기에는 아침에 손가락 관절이 굳어지는 증상이 나타난 후 부종, 동통, 발열, 운동제한, 강직 등이 나타나게 되는데 전신의 모든 관절에 적용될 수 있지만 특징적으로 손과 발의 근위지절관절과 중수지관절 및 중족지관절을 침범한다.26, 27) 이러한 증상들은 활막의 염증으로 인한 것으로 류마티스 관절염에서의 활막은 정상 활막과 달리 염증세포의 침윤, 활막 세포의 증식, 신생 혈관의 생성, 세포 표면의 부착 물질의 발현 증가, 다양한 사이토카인과 단백 분해/분해억제 물질의 발현 등의 병리소견이 뚜렷하게 관찰된다.[26)]

서양의학에서 류마티스 관절염의 원인으로 먼저 류마티스 관절염 진단 표식자로 잘 알려진 IgG에 대한 자가 항체인 RF와 Cyclic Citrullinated Peptide에 대한 항체가 류마티스 관절염의 진단과 병인에 중요하다고 알려졌다. 또한 활막을 증식시켜 관절염을 일으키는 것에 관여하는 fibroblast, CD8+와 CD4+ T세포, macrophage, mast cell, dendritic cell, B세포의 중요성이 새롭게 알려지게 되었다. 특히 과거에는 CD4+ T세포의 아형 중 Th1세포가 류마티스 관절염 초기 병인에 중요한 역할을 한다고 생각되었으나, 이후에는 Th17세포가 병인의 핵심 역할을 하여 이와 관련된 IL-17, IL-21, IL-6, TNF-α 등의 역할이 질병에 중요한 원인으로 인정되었고 골 미란과 관련된 RANKL같은 사이토카인들이 치료의 표적물질로 인정받게 되었다.[3)]

하지만 류마티스 관절염의 발병원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않아 바이러스 및 미생물 감염설, 자가면역학적 이상반응, 비타민 결핍설, 호르몬 부조화 등의 가설로 설명하고 있다.[28)] 또한 가계도 연구에 의하면 류마티스 관절염의 질병소질의 약 60%가 유전적 인자에 기인한다고 하였다.[29)]

원인이 명확하지 않기 때문에 류마티스 관절염을 완치시킬 수 있는 방법이 없으므로 조기 진단을 통해 염증반응을 최소화시켜 더 이상 관절이 변형되고 파괴되는 것을 막아주는 방향으로 치료법을 택하여 영구적인 관절 기능의 손실을 방지하는 약물요법을 시행한다. 질병 초기에는 선택적 COX-2 길항제, salicylate, NSAID 등과 같은 비스테로이드성 소염진통제를 사용하며 질병이 진행되어 골미란을 동반하게 되면 triamcinolone, prednisone과 같은 부신피질호르몬제제의 사용한다. 또한 적극적으로

methotrexate, sulfasalazine, auranofin 등과 같은 항류마티스제제(DMARDs)를 투여하게 되며, 증상 및 질병 활성도가 조절되지 않으면 TNF-α 길항제, IL-1, IL-6 수용체 길항제 등의 생물학적 제제를 사용하거나 병용하게 된다.[30-32]

최근의 류마티스 관절염에 대한 연구는 분자생물학, 생화학, 면역학 등의 발달 및 새로운 유발물질들과 면역조절물질의 발견으로 인해 면역학적인 접근이 주로 시도되고 있는데,[33] 이러한 노력으로 새로운 약물과 치료법이 등장하고 있지만 복용을 끊으면 다시 활성화되거나 실제 임상에서 효과가 미비하거나 지속력이 떨어지는 등 문제가 있어 아직 치료제 개발이 미비한 실정이다.[14] 또한 약물 복용의 부작용으로 우울증, 위장관의 궤양 유발, 장출혈, 간 기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 야기하고 있어 더 안전하고 효과적인 치료 방법이 필요한 시점이기 때문에 천연물의 연구 등의 한의학적 치료법에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.[21]

본 연구에서 사용한 桂芍知母湯은 『金匱要略』[8]에서 祛風散寒除濕하고 淸熱한다하여 歷節風에 사용한 처방[9]으로 桂芍知母加牛膝湯은 桂芍知母湯에 牛膝을 加한 처방이다. 김 등[14]의 연구에서는 牛膝이 류마티스 관절염에 효과가 있는 것으로 보고되었기에 桂芍知母湯에 加하여 본 연구에 사용하였다.

桂芍知母湯에 관한 기존 연구로는 김 등[10]의 연구에서는 桂芍知母湯이 혈액학적으로 소염, 진통작용이 있음을 보고하였고, 홍 등[11]의 연구에서는 桂芍知母湯加味方을 경구 투여하여 골관절염에 조직면역학적으로 어떠한 영향을 미치는지에 대해 보고하였다.

지금까지 류마티스 관절염의 한의학적 치료에는 김 등[34]의 鹿茸藥鍼, 장 등[35]의 加減補中益氣湯, 오[36]의 가시오가피, 안[4]등의 金銀花, 정[37]등의 陳皮, 박[38]등의 蒼朮桃仁湯加味 등의 약재, 약침, 처방이 사용되었는데 桂芍知母加牛膝湯을 약침의 형태로 투여한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 안전성 검사를 위해 간 기능, 신장 기능, 세포독성을 측정하였고, In vitro에서 항산화 효능 측정을 위해 총 phenol 함량, 총 flavonoid 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, ROS 생성량을 측정하였고, 항염증 효능 측정을 위해 NO 생성량, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-21, TNF-α, MCP-1, GM-CSF의 생성량을 측정하였다. 관절에 미치는 영향을 확인하기 위해서 3D μCT를 통해 관절 상태, 골밀도, 관절 염증 정도를 측정하고 병리조직학적 검사를 시행하였다.

간 기능과 신장 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 내에서 AST, ALT, creatinine, BUN 활성도를 측정한 결과 정상군에 비하여 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 2-5). 또한 세포 독성을 확인하기 위해 세포 생존율을 측정한 결과도 안전한 것으로 나타났다(Fig. 6).

Polyphenol 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignans, resveratrols 등을 총칭하며, 식물계에 널리 분포되어 있다.[40] 폴리페놀에 존재하는 다수의 히드록실기(-OH)는 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어나다.[41, 42] 식물에게만 존재하는 flavonoid는 폴리페놀 화합물의 한 종류로 C6-C3-C6의 기본 탄소 골격을 가지고 있으며 항바이러스, 항염증, 항암 효과 및 항산화효능이 높은 것으로 알려져 있다.[42,43]

DPPH radical 소거능 측정은 불안정한 유리기에 환원기능을 가진 proton ion을 제공하여 안정화 되도록 유도하는 기능으로 생체 내에서 발생하는 불안정하고 유해한 유리기를 안정화시키는 역할을 한다. 따라서 미지의 특정물질이 생체의 생리작용 혹은 산화작용에 의하여 발생하는 hydroxyl radical 혹은 superoxide radical 등을 제거하는 항산화 능력을 평가할 때 사용되는 지표로 높은 값일수록 항산화능이 우수한 것으로 판단한다.[40]

ABTS radical 소거능 측정은 화학반응을 통해 free radical이 유발된 용액에 시료를 넣어 항산화를 측정한다는 점에서 DPPH radical 소거능

측정과 다르며 단시간에 측정할 수 있고 pH의 변화에 민감하지 않다.[44]

세포내의 대사 과정의 결과로 생성되는 ROS(reactive oxygen species)는 연골조직을 파괴하는 물질 중 하나로 추측되고 있으며 직접적으로 조직을 손상시키지는 않지만 여러 기전에 의해서 반응성 높은 hydroxyl radical로 전환되어 조직에 손상을 주며 심혈관계 질환, 암, 염증, 노화 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.[45,46]

본 실험에서 GK 추출물에 존재하는 총 phenol 함량은 235.60±1.28 ㎎/g으로 나타났고 총 flavonoid 함량은 46.15±1.70 ㎎/g으로 나타났다(Table 4, 5). GK 추출물의 DPPH 소거율과 ABTS 소거율은 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가함을 보였다(Fig. 7, 8). 또한 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 100.0±1.0%로 나타냈을 때 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 9). 이상으로 보아 GK 추출물에 항산화 효능이 있음을 알 수 있었고 농도가 높을수록 그 효능이 증가하는 것으로 판단할 수 있었다.

NO는 혈관의 긴장, 혈소판 기능, 신경 전달, 면역 기능에서 중요한 역할을 하는 shortlived free radical로서 류마티스 관절염 및 골관절염 등에서 과량 생산되며 이것은 지속적인 염증과 조직 손상과 관련되어 있다.[47,48]

여러 가지 사이토카인과 케모카인이 류마티스 관절염의 관절 부위에 증가되어 있는데 이들은 주로 T세포, 활성화된 골수양세포, 대식세포 뿐 아니라 섬유아세포 및 내피세포 같은 관절구성 세포에서 주로 분비된다. 케모카인과 사이토카인의 활성도가 류마티스 활막 조직 염증, 활막 증식, 활액 염증, 연골 및 골 손상 등에서 뿐만 아니라 류마티스 관절염에서 전신증상을 나타내는 병인으로 역할을 할 것이라 여겨지고 있다.[3]

활막에서 발현되는 여러 사이토카인 중 TNF-α와 IL-1은 대식세포에서 생성되며 상위 사이토카인으로서, IL-6, GM-CSF, IL-8, 각종 chemokine 및 단백 분해효소와 같은 하위 염증 매개물의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고, 활막 세포의 증식을 항진시켜 관절의 손상을 일으킨다.[49]

IL-1은 주로 단핵구나 조직의 대식세포에서 만들어지지만 그 외에도 B세포나 혈관 내피세포, 또는 활성화된 T 세포에서도 만들어지며 그 중 IL-1β는 주로 secreted molecule로 작용한다.[50] 류마티스 관절염 환자에서 혈중 IL-1β의 농도와 ESR, Ritchie joint index, 통증의 강도와 비례하고[51] 관절파괴와도 연관이 있음이 알려져 류마티스 관절염에서 중요한 역할을 함이 증명되었다.[52]

IL-6는 21-28 kDa의 사이토카인으로 류마티스 활막 조직과 활막액에서 발현이 증가되는 사이토카인 중 하나이다. 주로 대식세포, 섬유아세포 또는 혈관 내피 세포에서 만들어지고 그 외에도 T 세포, B세포, 연골세포, 조골세포 등 매우 다양한 세포에서 발현한다.[2, 50] IL-6의 항염증 작용은 T 세포의 증식과 활성화 및 B 세포의 분화를 통해 일어난다. 또한, 조혈모세포의 분화와 증식을 일으키고, 파골 세포를 활성화시킨다.[2] 류마티스 관절염 환자의 활액 및 혈청에서 IL-6의 수치가 증가되어 있고,[53,54] 류마티스 관절염에서의 만성 활막염의 정도와 활액 내 IL-6의 농도가 비례하며,[55] 혈청 내 IL-6의 농도와 C-reactive protein, Ritchie articular index, 조조강직의 시간이 서로 연관되어 있어[56] IL-6도 류마티스 관절염에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

IL-17은 TNF-α와 IL-1 같은 주요 사이토카인들과 IL-6, IL-8, 단백분해효소 등의 분비를 유도하여 염증반응을 항진 시키고, RANKL 발현을 촉진하여 파골 세포의 분화를 유도한다.[2] 또한 급성 관절염을 만성화시키는 역할을 하고,[57] 기존의 사이토카인들(TNF-α, IL-1)과 상승작용을 통하여 염증반응을 더욱 심화시킴이 밝혀졌다.[58] 이러한 사실들은 염증을 매개시키고 류마티스 관절염이 만성화되는 것에 IL-17이 중요한 역할을 함을 의미한다.

IL-21은 1형 사이토카인으로 활성화된 CD4+ T세포에서 생성되며,[59] 류마티스 관절염 환자에

서 염증이 발생한 활막, 말초 혈액과 윤활액의 백혈구에서 IL-21 수용체의 발현이 증가되어 있고, 실험실 연구에서 IL-21이 말초혈액과 윤활액 T 세포의 활성화와 증식을 촉진하며 TNF와 IFN의 생성을 증가시킨다는 보고가 있었다.[60] 이것으로 보아 류마티스 관절염과 IL-21은 연관되어 있음을 알 수 있다.

TNF-α는 주로 단핵구나 대식세포에서 생성되지만 natural killer cell이나 T 세포, B 세포에서도 생성될 수 있으며 p55와 p75 두 종류의 수용체에 결합하여 그 작용을 나타낸다.[50] 류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액에서 TNF-α가 증가되어있고, TNF-α의 농도와 적혈구 침강속도 및 활액의 백혈구 수가 비례함이 보고되었고,[61,62] 다양한 실험적 방법을 이용하여 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 TNF-α의 mRNA와 단백질 발현이 증명되어,[63,64] TNF-α가 류마티스 관절염의 병리에 중요 사이토카인으로 인식되었다. MCP-1은 C-C 케모카인 계열로 류마티스 관절염, 이식거부반응, 알러지성 결막염, 천식 등과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.[66] MCP-1은 활성화된 단핵구나 대식세포를 끌어들이는데 있어서 중요한 역할을 하며, IL-1, IL-4, TNF-α 등의 염증성 사이토카인에 반응하여 발현이 증가된다.[50]

GM-CSF는 TNF-α, IL-1, IL-18 등의 자극에 의해 생성이 조절되며 다른 염증성 사이토카인과 케모카인과 마찬가지로 류마티스 관절염에서 그 생성량이 증가되어 있다.[58] GM-CSF는 류마티스 관절염의 기전 중 항원-비특이적 기전에 작용을 하는데 비특이적 자극에 의해 활막 내 대식세포가 활성화되고 여기서 생산된 TNF-α나 GM-CSF 등의 사이토카인에 의해 수지상 세포의 분화가 유도되며 이것이 강력한 항원제시 세포로 기능하여 자가항원을 autoreactive T cell에 전달함으로써 T 세포가 자극되어 관절염이 시작된다.[67]

본 실험에서 GK 추출물의 RAW 264.7 세포에서 NO 생성량은 대조군을 100.0±3.7%로 나타냈을 때 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 10). IL-1β 생성량은 1, 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Fig. 11). IL-6 생성량은 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12). IL-17 생성량은 GK 추출물 1 ㎍/ml 농도에서 13.9±1.1 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 12.4±3.0 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 13.1±1.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 13). IL-21 생성량은 1, 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Fig. 14). TNF-α 생성량은 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 15). MCP-1 생성량은 대조군에 비하여 10, 100 (㎍/ml)의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 16). GM-CSF 생성량은 GK 추출물 1 ㎍/ml 농도에서 22.8±3.8 pg/ml, 10 ㎍/ml 농도에서 24.1±4.2 pg/ml, 100 ㎍/ml 농도에서 24.3±5.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 17). 이상으로 보아 GK 추출물은 NO의 생성과 염증과 관련된 여러 사이토카인과 케모카인의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

GKHA 투여가 관절에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험 종료 후 후족부를 3D μCT를 통해 관절 상태, 골밀도, 관절 염증 정도를 측정하였고, 조직 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 H&E와 M-T 염색을 하여 병리조직학적 검사를 시행하였다. 그 결과 대조군에서는 정상군에 비하여 관절의 변형 및 파괴가 크게 일어났으나(Fig. 18-A, B 사각형), GKHA 군에서는 양성 대조군과 더불어 관절의 변형 및 파괴가 적게 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 18-C, D 사각형). 또한 BV(bone volume)에 대한 ratio를 산출하여 골밀도를 측정한 결과 대조군에 비하여 증가를 나타내었다(Fig. 19).

이상의 실험 결과를 종합하면, 桂芍知母加牛膝湯이 RAW 264.7 세포에서 항산화 작용과 항염증 작용을 함을 알 수 있었고, 桂芍知母加牛膝湯

의 약침 투여가 류마티스 관절염을 유발된 DBA/1 생쥐에서 혈청 내 사이토카인 및 케모카인의 생성과 유전자 발현을 억제하고, 류마티스 관절염의 증상 호전에 효과가 있음을 확인하였다. 또한 관절, 연골, 활막세포의 변형 및 손상을 억제시키고 골밀도를 증가시켜 관절을 보강하고 관절염의 진행을 저해하는 효과를 확인하였기에 桂芍知母加牛膝湯의 약침 투여가 류마티스 관절염의 치료법으로서 가능성이 있다고 사료된다. 향후 이 치료법을 임상에 활용한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

桂芍知母加牛膝湯의 약침투여가 류마티스 관절염에서의 치료효과를 규명하고자 RAW 264.7 세포를 통해 In vitro에서 桂芍知母加牛膝湯 추출액의 항산화효능과 NO 및 IL-1β, IL-17, TNF-α 등의 사이토카인과 케모카인의 생성량을 측정하여 항염증효능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간과 신장의 기능에 독성을 나타내지 않았고 세포독성 또한 나타나지 않았다.

<In vitro>

1. 桂芍知母加牛膝湯 추출물에 존재하는 총 phenol 함량과 총 flavonoid 함량은 높게 측정되었다.

2. 桂芍知母加牛膝湯 추출물에 존재하는 DPPH 소거능과 ABTS 소거능은 농도에서 유의성 있게 증가하였다.

3. 桂芍知母加牛膝湯 추출물에 존재하는 ROS 생성 저해 활성은 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있게 감소하였다.

4. NO, IL-6, TNF-α, MCP-1 생성량은 10, 100 (㎍/ml) 농도에서 유의성 있게 감소하였다. IL-17, GM-CSF 생성량은 모든 농도에서 유의성 있게 감소하였다. IL-1β, IL-21 생성량은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

참고문헌

1. Lacey D, Sampey A, Mitchell R et al. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum 2003 ; 48 : 103-9.
2. 송영욱. 최근 조명된 류마티스 관절염의 병태생리. 대한내과학회지. 2009 ; 76(1) : 1-6.
3. 김지민, 김호연. 류마티스 관절염의 병인. 대한의사협회지. 2010 ; 53(10) : 853-61.
4. 안상현, 김호현. LPS 유도 생쥐 관절염에서 금은화의 MIF 활성 조절이 COX-2와 MMP-9 생성 억제에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2010 ; 24(2) : 242-8.
5. Chung SH. The Study on classification and treatment of Arthalgia Syndrome. The Korean Acedemy of Oriental Rehabilitation Medicine. 1991 ; 2(1) : 56-66.
6. 이재동. 류마티스 관절염의 한방치료. 경희의학. 2004 ; 20(1) : 4-9.
7. 신미경, 노성수, 서영배. 동충하초 추출물이 콜라겐으로 유발된 관절염 생쥐 모델에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22(3) : 57-65.
8. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北 : 台聯國風出版社. 1973 ; 32-3.
9. 권재식, 김기현, 김형태, 박응호, 서성훈. 痺症. 서울 : 정담출판사. 1993 ; 23-4, 207-71.
10. 김순신, 김혜경, 최종원, 이정규. 계작지모탕의 소염.진통작용 및 Alcohol성 고뇨산혈증에 미치는 영향. 생약학회지. 1995 ; 26(1) : 66-73.
11. 홍성민, 오민석. 계작지모탕가미방이 골관절염에 미치는 영향. 대한재활의학회지. 2013 ; 23(4) : 39-57.
12. 양기상. 처방구성을 위한 한약의 배합과 응용 : 전통의학연구소. 1993 ;360,361
13. 임진석. 本經疏證(下). 서울: 아티전. 1998;

506-8.
14. 김창수, 박용기. 우슬의 콜라겐 유도 관절염 생쥐에 대한 개선 효과. 대한본초학회지. 2010 ; 25(4) : 129-35.
15. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society. 1981 ; 58(11) : 966-8.
16. Nieva M, María I, Antonio R, Marta A, Vattuone. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of ethnopharmacology. 2000 ; 71(1) : 109-14.
17. Lipsky, P.E. Rheumatoid arthritis. Harrison's principle of internal medicine, 16th ed. New York : Mc Graw Hill. 2005 ; 1968-77.
18. The Korean orthopaedic. orthopedics, 5th ed. Seoul : Choishin medical republising company. 2005 ; 175-6.
19. 楊維傑. 黃帝內經素問靈樞譯解. 서울 : 成輔社. 1980 ; 315-28.
20. 손희천, 금동호, 이명종. 해동피가 콜라겐 유발 흰쥐의 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2002 ; 13(1) : 67-76.
21. 한방재활의과학회. 한방재활의과학. 서울 : 군자출판사. 2003 ; 78.
22. 方藥中, 李克光, 鄧鐵濤, 金壽山, 黃星垣, 董建華. 實用中醫內科學. 서울 : 醫聖堂. 1993 ; 558-9.
23. 강인수. 비증치료의 용약에 대한 소고. 대한한의학회지. 1990 ; 11(1) : 245-52.
24. 제정진. 血府逐瘀湯이 Adjuvant유발 관절염에 미치는 영향[dissertation]. 서울 : 경희대학교 대학원. 1993.
25. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2001 ; 358 : 903-11.
26. 의학교육연구원. 가정의학. 서울 : 서울대학교출판부. 1987 ; 123-5, 132-4.
27. 조영두, 한효상, 이영종. 천파석이 콜라겐유도 생쥐관절염에 미치는 억제효과. 대한본초학회지. 2010 ; 25(4) : 137-43.
28. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. Arthritis Rheum. 2000 ; 43 : 30-7.
29. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1989 ; 41 : 1552-63.
30. Kremer JM, Westhovens R, Leon M et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. N Engl J Med. 2003 ; 349 : 1907-15.
31. Seo YI. New drugs for rheumatoid arthritis. Kor J Medicine. 2009 ; 76 : 12-7.
32. 김영태, 이제동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험논문의 경향. 대한침구학회지. 2001 ; 19 : 190-4.
33. Kim KS, Choi YH, Choi WS, Song IK, Park JS, Lee SD. 녹용약침액이 생쥐의 Type2collagen유발관절염과 인산이온 유발 연골세포의 세포사에 있어 보호작용에 관한 연구. 대한침구학회지. 2002 ; 19(5) : 10-27.
34. 김영화. 해동피약침이 collagen-induced arthritis억제 및 면역조절에 미치는 영향[dissertation]. 대전 : 대전대학교 대학원. 2007.
35. 장선일, 윤용갑. DBA/1J마우스에서 加減補中益氣湯이 콜라젠 유도 관절염 억제에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2003 ; 18(3) : 143-51.
36. 오충환, 김순중, 서일복. 가시오가피가 흰쥐

의 collagen유발 관절염 발생및 치료에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2005 ; 15(3) : 55-73.
37. 정진기, 손건호, 김영식, 박용기. 陳皮 에탄올추출물의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 항관절염 효과 연구. 대한본초학회지. 2011 ; 26(3) : 1-6.
38. 박장우, 오민석. 창출도인탕가미방이 DBA/1J 생쥐의 collagen 유발 관절염 억제에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2010 ; 31(2) : 19-35.
39. 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색. 한국식품과학회지. 2012 ; 44(3) : 337-42.
40. Lu Y, Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food chemistry. 2000 ; 68(1) : 81-5.
41. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry. 2002 ; 13(10) : 572-84.
42. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids : antioxidants or signaling molecules. Free Radical Biology and Medicine. 2004 ; 36(7) : 838-49.
43. 정창호, 정희록, 최성길, 심기환, 허호진. 시판 메밀차 열수 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과. 한국식품저장유통학회지. 2011 ; 18(3) : 358-65.
44. 정현실, 송영선, 노경희 et al. 부추가 Streptozotocin 유발 당뇨쥐의 지질과산화와 항산화방어체계에 미치는 영향. 한국생명과학회지. 2003 ; 13(3) : 333-42.
45. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med. 2000 ; 108(8) : 652-9.
46. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthtitis Rheum. 1998 ; 41(7) : 1141-51.
47. McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. J Immunol. 2001 ; 166(4) : 2734-40.
48. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 2007 ; 370 : 1861-74.
49. 지종대. 류마티스 관절염에서 사이토카인의 발현과 역할. Hanyang medical reviews. 2005 ; 25(2) : 43-52.
50. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. Lancet. 1988 ; 2 : 706-9.
51. North J, Situnayake RD, Tikly M, et al. Interleukin 1beta, hand and foot bone mineral content and the development of joint erosions in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1994 ; 53 : 543-6.
52. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum. 1988 ; 31 : 784-8.
53. Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. Eur J Immunol. 1988 ; 18 : 1797-801.
54. Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with

chronic synovitis in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 1993 ; 13 : 45-51.
55. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis : correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann Rheum Dis. 1993 ; 52 : 232-4.
56. Lubberts E, Schwarzenberger P, Huang W et al. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. J Immunol. 2005 ; 175 : 3360-8.
57. Chabaud M, Miossec P. The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1293-303.
58. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. Immunol Rev. 2004 ; 202 : 84-95.
59. Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. Scand J Immnol. 2006 ; 64 : 515-22.
60. Barrera P, Boerbooms AM, Janssen EM, et al. Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. Longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. Arthritis Rheum. 1993 ; 36 : 1070-9.
61. Saxne T, Palladino MA, Jr., Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. Arthritis Rheum. 1988 ; 31 : 1041-5.
62. Husby G, Williams RC, Jr. Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. J Autoimmun. 1988 ; 1 : 363-71.
63. 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.
64. 조주연. 사람 단핵구 U-937 세포의 케모카인 생성에 미치는 Mycoplasmas lysate의 영향[dissertation]. 부산 : 고신대학교 대학원. 2003.
65. 임준희, 권택규. Luteolin의 IL-1β에 의한 MCP1 단백질 발현 증가에 미치는 영향. Journal of Life Science. 2009 ; 19(4) : 514-9.
66. Thomas R, Lipsky PE. Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1996 ; 39 : 183-90.