

仙茅 熱水 추출물의 Collagen 유발 관절염에 대한 약리 효능 연구

서부일^{1#}, 노성수¹, 박지하¹, 박찬익², 구진숙^{3*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 대구한의대학교 향산업학과,
3 : 안동대학교 자연과학대학 생약자원학과

Research of Efficacy of Curculiginis Rhizoma aquaous extract on collagen induced arthritis

Bu Il Seo^{1#}, Seong Soo Roh¹, Ji Ha Park¹, Chan Ik Park², Jin Suk Koo^{3*}

1 : Department of Korean Medicine, Daegu Haany University,
2 : Department of Aroma Applied Industry, Daegu Haany University,
3 : Dept. of Bioresource Science, Andong National University

ABSTRACT

Objectives : In Korean medicine, Curculiginis Rhizoma was treated for arthritis in remedy. But efficacy of Curculiginis Rhizoma on collagen induced arthritis was not revealed.

Methods : Anti inflammatory effect of Curculiginis Rhizoma was researched *in vitro* with RAW264,7 cell and cell toxicity, levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12) and PGE2 were analyzed by ELISA assay. Inflammatory protein were analyzed by western blotting assay (JNK, ERK, COX-2, TNF- α and IL-1 β). *In vivo*, collagen induced arthritis mice model was used to evaluate anti-inflammation effect through arthritis index, immune cell number and cytokine levels (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) in serum.

Results : ECR(Extract of Curculiginis Rhizoma) has not shown cell toxicity in 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on RAW264,7 cell. ECR suppressed releases of NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 and PGE2 on RAW264,7 cell treated with lipopolysaccharide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). And ECR inhibited regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA, reduced protein release of JNK, ERK, iNOS, COX-2, IL-1 β and TNF- α . AI of group treated with ECR 200 mg/kg and 100 mg/kg were significantly decreased compared to vehicle arthritis mice, the number of immune cell in foot joint was increased on control mice but those of group treated with ECR 200 mg/kg and 100 mg/kg were significantly reduced. This results correspond with contents of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in serum.

Conclusions : Curculiginis Rhizoma has anti-inflammation effect on RAW264,7 cell *in vitro* and collagen induced arthritis *in vivo*. So it is necessary to research more mechanism for cascade impact.

Key words : Curculiginis Rhizoma, anti-inflammation, collagen, arthritis

I. 서 론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis)은 전신성 자가 면역 질환으로, 만성적인 염증과 다발성 관절의 파괴를 특징으로 하는 질환이다^{1,2)}. 최근에 와서 치료비용과 사회경제적인 비

용이 계속해서 증가하고 있는 추세를 띠고 있으므로^{1,2,3)}, 류마티스 관절염에 대하여 관심이 많이 증대되고 있다. 근래에 와서, 류마티스 관절염에 대한 병태생리에 대한 이해의 증가로 인하여 치료에 많은 진보가 있었으나, 약물의 부작용, 높은 약제비용 등의 어려움이 존재하고, 완화와 악화를 반복하면서

*Corresponding author : Jin Suk Koo, Dept. of Bioresource Science, Andong National University.

· Tel : +82-54-820-5845 · E-mail : kimkoo1114@andong.ac.kr

#First author : Bu Il Seo, Department of Korean Medicine, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1876 · E-mail : jangsan@dhu.ac.kr

· Received : 24 May 2016 · Revised : 21 June 2016 · Accepted : 18 July 2016

그 증상이 오랫동안 지속되는 등의 문제점이 있으므로^{3,4)}, 다양한 치료법이 시도되고 있으며, 한약이나 한약재를 이용한 한의치료도 비교적 좋은 치료법으로 우리나라 국민들 속에서 인정받고 있다.

Collagen으로 유발시킨 관절염은 류머티스 관절염과 육안적, 조직학적이거나 면역 담당 세포의 활성화 측면에서 비슷하게 관찰되므로^{5,6,7)}, 류머티스 관절염(CIA ; collagen-induced arthritis)의 실험모델로 많이 사용되고 있다⁸⁾.

仙茅는 수선화과(Amaryllidaceae)에 속하는 다년생 초본인仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn.의 뿌리줄기를 기원으로 하고 있는 한약재이며^{9,10)}, 補腎陽, 溫脾陽, 強筋骨, 祛寒濕하는 효능을 지니고 있는 한약재로^{9,10)}, 한의학 임상에서 많이 활용되고 있다.

한의학에서는 關節炎을 歷節風, 鶴膝風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 痛痺, 痺痛, 痹證, 痺症, 風痺, 痛痺 등의 범주에 속한다고 보고 있으며¹¹⁾, 관절염의 치료방법으로는 實證인 경우에는 주로 祛風, 散寒, 除濕, 溫通經脈, 清熱, 化痰祛痰, 活血通絡 등의 방법을 활용하고 있으며, 虛證의 경우에는 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝, 補肝腎 등의 방법을 활용하고 있다^{11,12,13)}. 이에 저자는 祛寒濕, 強筋骨하는 효능을 지니고 있는仙茅가 관절염에 효과가 있을 것으로 파악하였고, 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여, *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통하여 분석하고자 하였으며, DBA/101aHsd 생쥐에 collagen II (CII)로 관절염을 유발시킨 후에仙茅의 熱水 추출물을 투여한 결과, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 제조방법

본 실험에 사용한仙茅(*Curculigo orchoides* Gaertn ; *Curculiginis Rhizoma*)는 음니허브 (영천, 경북, 한국) 제약 회사에서 500 g을 구매하여, 약전 규격에 부합되는 것만을 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 시료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate(MTX), 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, TMB, antibody biotin-conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate(DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxymethylthioxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma(USA) 제품을, IL-1, IL-6와 TNF- α 는 ELISA kit(Biosource, USA), antibody Avidin-HRP conjugated(R&D system, USA), 우태아 혈청(fetal bovine

serum, FBS)은 Hyclone 사(Logan, USA) 제품을, DMED은 Gibco社(Gaithersburg, MD, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen社(Torreyana, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 멀티플렉스 ELISA bid 분석 키트는 Milipore사 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), microwave oven(LG, Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Centrifuge, Sigma), Deep-freezer(Sanyo, Japan), primus 96 thermocycler system(MWG Biotech, Germany), turbo thermal-cycler TM(Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision, Korea), CO₂ incubator(Forma scientific Co., USA), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001, Korea), vacuum pump, rotary vacuum evaporator(Büchi 461, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), autoclave(Hirayama, Japan), imager system(Kodak, USA), plate shaker(Lab-Line, USA), ELISA reader (Molecular devices, USA), cell strainer(FALCON, USA), 96-well Costar 접시(Corning Inc, Cambridge, Mass, USA) 및 homogenizer(OMNI, USA) 등을 사용하였다.

3. 실험 재료 및 추출방법

仙茅의 열수 추출은 분쇄기로 분쇄한 다음 시료 100 g에 증류수 1 L를 넣고, 100℃에서 3시간 열수 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 미리 항량된 수기에 넣어 45~50℃의 수온에서 rotary vacuum evaporator(JP/N-1000X, EYELA)를 사용하여 감압농축 후 동결건조 (FD5508, IIShin)하였다. 추출물(Extract of *curculiginis rhizoma* ; ECR)은 초저온냉동고에 보관하면서 세포실험과 동물실험에 필요할 때마다 적당량을 증류수에 희석하여 사용하였다.

4. 세포배양

마우스 대식 세포주인 Raw264.7 cell은 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Raw264.7 cell은 10% Fetal Bovine Serum (FBS)를 첨가한 DMEM을 이용하여 5% CO₂, 37℃에서 배양하였다.

5. 세포독성 및 NO 생성량 분석

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Cell counting Kit-8을 이용하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/well 분주한 후 Seeding 한 후 증숙 시료를 정해진 농도로 ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 6 μ g/ml, 3 μ g/ml 농도로 각각 처리한 후 24시간 동안 배양하여 CCK-8 용액을 처리하고 37℃ Incubator에서 30분 동안 반응시켰다. CCK-8 측정은 ELISA(Multiscan spectrum, Thermo Scientific)를 이용하여 분석하였다.

NO 측정은 Raw264.7 cell을 96 well plate에 1×10⁵

cells/well 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1 µg/ml 처리한 후 정해진 농도의 ECR을 처리한 후 24시간동안 배양한 후 배지에서 분비된 Nitric oxide를 Griss reaction에 기초한 NO colorimetric assay(R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)로 분석하였다. 세포가 생산한 NO는 Sodium Nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO 함량을 정량하였다.

6. 사이토카인 및 Prostaglandin E2(PGE2) 측정

Raw264.7 cell을 12 well plate에 5 × 10⁵ cells/well 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1 µg/ml 처리한 후 정해진 농도의 증숙 시료를 처리한 후 24 시간동안 배양한 후 배지에서 분비된 PGE2(R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 PGE2 kit를 이용하여 측정하였다. PGE2 함량은 다기능 마이크로플레이트 리더기에서 540 nm에서 측정하였다. 대식세포가 생산한 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12)은 Multi-analyte ELISA Array kit(Milipore)를 사용하여 luminex luminometer(Awareness Technology Inc., Pal City, FL, USA) 리더기에서 490 nm에서 측정하였다.

7. RT-PCR

Raw264.7 cell을 12 well plate에 5 × 10⁵ cells/well 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다. 분주한 세포에 LPS 1 µg/ml 처리한 후 정해진 농도의 증숙 시료를 처리한 후 24 시간동안 배양한 후 세포를 수집하였다. 수집된 세포는 RNeasy spin column을 이용하여 synovial 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 µl 10mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides(25 pmole/25µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor(20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5 × RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

PCR은 항온수조 방식의 Turbo Thermalcycler TM(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, interleukin-6(IL-6), interleukin-12(p35, IL-12), interleukin-12(p40, IL-12), 그리고 interferon-γ (IFN-γ)를 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmole/µl)와 antisense

primer(20 pmole/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10 × PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 µl Taq polymerase(5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation ; 95°C, 5분, denaturation ; 95°C, 1분, annealing ; 55°C, 1분, elongation ; 72°C, 1분씩 25 cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 ;

TNF-α 는, sense oligonucleotide,
5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3' ;
antisense oligonucleotide,
5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'(size : 487).

IL-1β 는, sense oligonucleotide,
5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3' ;
antisense oligonucleotide,
5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3' (size : 365).

IL-6는, sense oligonucleotide,
5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3' ;
antisense oligonucleotide,
5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3' (size : 547).

β-actin은, sense oligonucleotide,
5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' ;
antisense oligonucleotide,
5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'(size : 493).

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

8. Western Blot analysis

RAW264.7 대식세포를 2 × 10⁵ cells/mL의 농도로 6-well plate에 분주하여 12시간 배양한 후에 ECR을 농도별(100, 200 µg/ml)로 처리한 다음, LPS 1 µg/ml를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 세포를 얻어 원심분리하여 pellet에 lysis buffer를 가하여 얼음에 incubation 후 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 상등액을 모았다. 모든 상등액은 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 20 µL을 5 × sample buffer에 넣고 100°C에서 5분간 불활성화 시킨 후 12% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transblotting 한 후 5% non-fat dry milk에서 90분 동안 blocking 하였다. JNK, ERK, iNOS, COX-2, IL-1β, TNF-α 와 GAPDH 항체(Promega사)는 각각 1 : 1,000,

1 : 2,000의 비율로 4°C에서 overnight 시킨 후 tris-buffered saline Tween-20(TBST) buffer로 10분간 3회 washing하였고 2차 항체는 1 : 1,000의 비율로 희석하여 2시간 상온에서 부착시켰다. TBST buffer로 10분간 3회 washing한 membrane에 ECL(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 처리하여 LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

9. 동물 분리 및 관절염 유발

실험 동물은 FOLAS INTERNATIONAL(서울, Korea)에서 분양받은 6주령의 DBA/10IaHsd mice를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1 % 이상, 조지방 8.0 % 이하, 조섬유 5.0 % 이하, 조회분 8.0 % 이하, 칼슘 0.6 % 이상, 인 0.4 % 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

관절염 유발은 collagen II (CII) 와 complete adjuvant를 DBA/1J 생쥐의 꼬리 피하주사를 통하여 시행 하였고, 10마리씩을 한 군으로 하여 정상군, 대조군(C), ECR 투여 200 mg/kg와 100 mg/kg 4개 군으로 나누었다. ECR은 각각 농도별로 CII 1차 접종 후 5주(35일)간 1일 1회씩 경구 투여하였다.

10. 관절염 지수 분석

2차 CII 접종 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발(paw)에서 관절염 징후를 0 = no arthritis, 1 = small degree of arthritis, 2 = light swelling, 3 = medium swelling, 4 = severe swelling, 5 = severe swelling and non-weight-bearing 등으로 구분한 뒤, 각 4개의 발에 각 등급에 따라 0~5점까지 점수를 부여 하고, CIA 유발 정도를 1주일 간격으로 기록하였다.

11. 관절세포수 분석

관절은 잘게 가위로 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker(180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수(absolute number)를 산출하였다.

12. 혈청 내 사이토카인 분석

4주간 index 값을 측정 후, ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 TNF- α , IL-1beta, IL-6 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA, biosource, USA)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l(1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안

실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

13. 통계처리

모든 실험값은 평균 \pm 표준오차(mean \pm SD)로 표시하였으며, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 결 과

1. 선모열수 추출물의 세포독성에 대한 영향

대식세포에 대한 세포독성 측정결과, 최대 200 μ g/ml 처리시 세포 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

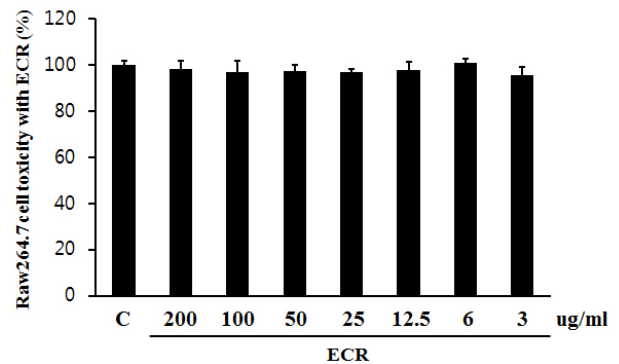


Fig. 1. MTT assay of ECR

Cell toxicity was measured over a 24 h period with a different concentration of ECR (200, 100, 50, 25, 12.5, 6 and 3 μ g/ml). The data represent the mean \pm SD of four separate experiments.

2. 대식세포 NO 생성 억제 효능 평가

선모 열수 추출물을 50 μ g/ml 처리시 NO 생성 억제능은 87.4 \pm 3.4%로 유의성 있는 억제 효능이 나타났으며, 100 μ g/ml 처리시 NO 생성 억제능은 78.4 \pm 4.3%로 유의성 있는 억제 효능을 보였으며, 200 μ g/ml 처리시 NO 생성 억제능은 대조군에 비해 70.6 \pm 5.8%로 유의성 있는 억제 효능이 나타났(Fig. 2).

3. RAW264.7 대식세포 사이토카인 생성에 대한 억제 효능

대식세포에 ECR을 농도별로 처리한 후, 배양액 내 사이토카인을 분석한 결과, LPS를 처리한 TNF- α 는 대조군에서 32.4 \pm 2.1 ng/ml이었고, ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml로 처리한 실험군의 생성량은 각각 24.8 \pm 3.4, 30.4 \pm 2.6, 32.5 \pm 4.1 ng/ml으로 ECR을 200 μ g/ml 농도로

처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$).

LPS를 처리한 IL-1 β 는 대조군에서 55.4 ± 6.7 pg/ml이었고, ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml로 처리한 실험군의 생성량은 각각 40.8 ± 2.1 , 48.7 ± 5.9 , 50.3 ± 3.1 pg/ml으로 ECR을 200 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$).

LPS를 처리한 IL-6는 대조군에서 137 ± 9.4 pg/ml이었고, ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml로 처리한 실험군의 생성량은 각각 80.4 ± 6.7 , 100.4 ± 12.4 , 119.4 ± 8.7 pg/ml으로 ECR을 200 μ g/ml와 100 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$, $p < 0.05$).

IL-12는 대조군에서 410.4 ± 25.4 ng/ml이었고, ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml로 처리한 실험군의 생성량은 각각 304.1 ± 19.8 , 320.4 ± 34.1 , 376.4 ± 31.6 ng/ml으로 ECR을 200 μ g/ml와 100 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$, $p < 0.05$).

PGE2 생성량은 LPS 처리 대조군에서 98.4 ± 4.7 ng/ml이었고, ECR을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml로 처리한 실험군의 생성량은 각각 69.7 ± 5.7 , 82.9 ± 8.4 , 90.7 ± 12.4 ng/ml으로 ECR을 200 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다($p < 0.01$)(Fig. 3).

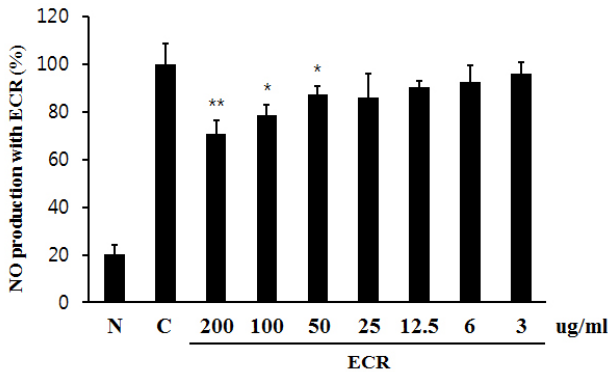


Fig 2. Effects of ECR on nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages for 24 h. The normal group (N) was treated with media only. The control group (Con) was treated with LPS (1 μ g/mL) alone. NO production was measured by the Griess reaction assay and expressed as a percentage of the control group. Values are the mean \pm SEM of the three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs C.

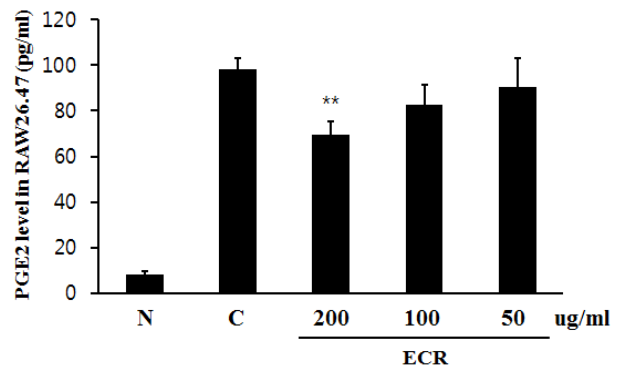
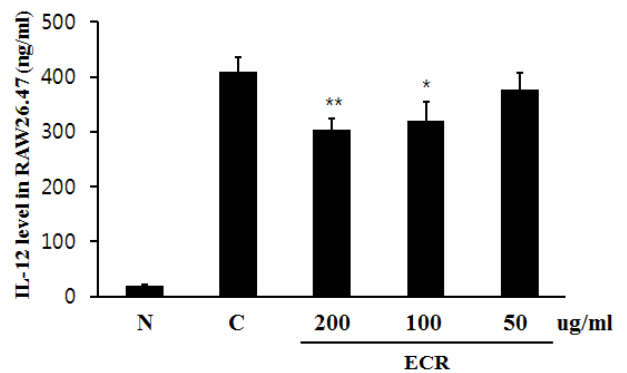
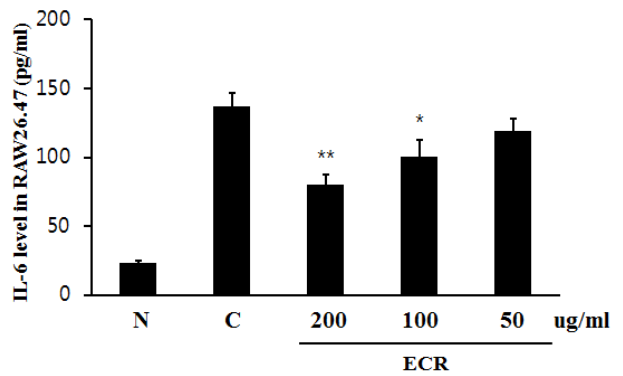
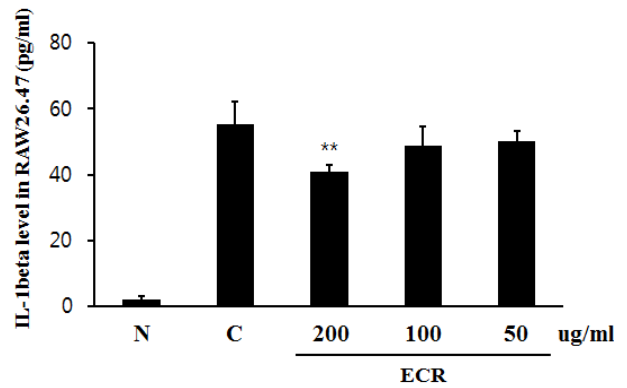
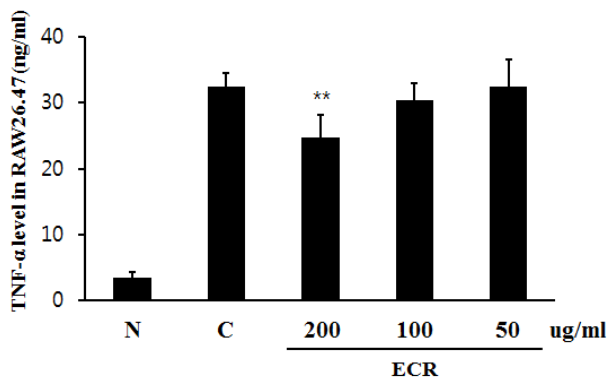


Fig. 3. Effects of ECR on inflammatory cytokines production in LPS stimulated RAW264.7 macrophages for 24 h. The normal group (N) was treated with media only. The control group (C) was treated with LPS (1 μ g/mL) alone or with ECR respectively 200, 100 and 50 μ g/ml. Cytokine concentrations in the culture medium were measured by a Multiplex bead-based cytokine assay after 24 h incubation. Values are the mean \pm SEM of the three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs C.

4. TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 및 염증성 단백질 발현에 미치는 효능

In vitro 대식세포 실험결과, LPS를 처리한 대조군의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 발현이 증가된 반면, ECR 처리군에서는 농도의존적으로 감소되었다. 또한 JNK, ERK, iNOS, COX2, IL-1 β 및 TNF- α 단백질 발현량이 LPS를 처리한 대조군에서는 증가되었으며, ECR 처리군에서는 농도의존적으로 감소되었다(Fig. 4).

5. 관절염 지수에 대한 영향

콜라겐 유발 관절염 생쥐의 관절염 지수(Arthritic index; AI)를 측정된 결과, 대조군의 AI는 18.2 ± 1.1 으로 나타났다으며, ECR을 200 mg/kg으로 투여한 실험군의 AI는 13 ± 1.0 ($p < 0.01$), 100 mg/kg으로 투여한 실험군의 AI는 15.7 ± 1.7 로 유의성있게 감소되었다 ($p < 0.05$)(Fig. 5).

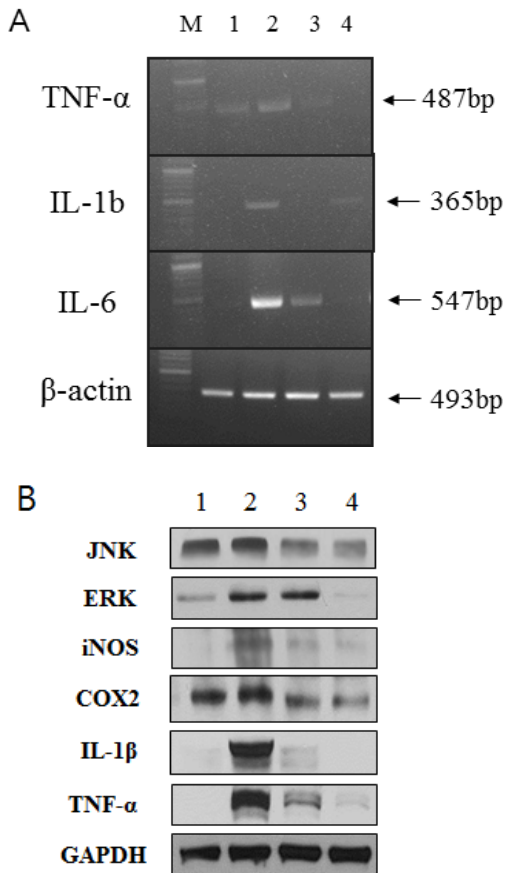


Fig. 4. Inhibitory effects of ECR on cytokine mRNA and inflammatory protein expression in RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were cultured with ECR 200 ug/ml, 100 ug/ml and 50 ug/ml plus LPS 1 ug/ml for 6 hrs. RT-PCR was performed by cytoplasmic RNA isolated. Western blot analysis was performed by protein isolated.

A : Lane M, 100bp DNA marker ; lane 1, LPS (1 ug/ml) ; lane 2, LPS (1 ug/ml) + ECR (50 ug/ml) ; lane 3, LPS (1ug/ml) + ECR (100 ug/ml) and lane 4, LPS (1ug/ml) + ECR (200 ug/ml) and internal control (b-actin).

B : lane 1, basal ; lane 2, LPS (1 ug/ml) ; lane 3, LPS (1 ug/ml) + ECR (100 ug/ml) ; lane 4, LPS (1 ug/ml) + ECR (200 ug/ml) and internal control (GAPDH).

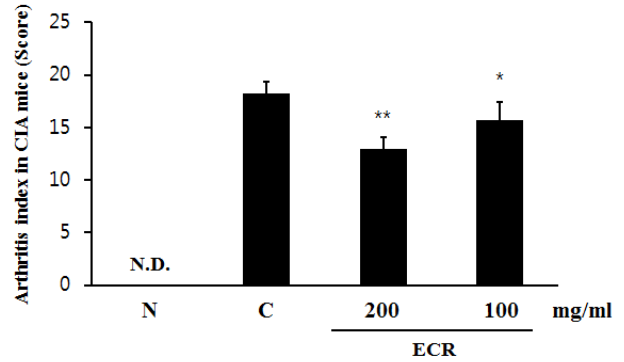


Fig. 5. Effects of ECR on the arthritis index (AI) in Murine CIA DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of CII on days 0 and 14. Each sample group was orally administrated of ECR (p.o, 200 mg /kg) or ECR (p.o, 100 mg/kg) for 42 days beginning on the day after the first immunization. The AI was calculated from measurement taken the day after the final drug treatment. Each point represents the mean \pm S.E of 10 mice. Statistically significant value was compared with control data by Student's t-test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

6. 족관절 면역세포수 및 염증 세포 변화에 대한 영향

관절염 유발 동물의 족관절 내 면역세포수를 측정된 결과, 정상군의 세포수는 $4.4 \pm 0.9 (\times 10^6)$ 였고, 관절염 대조군의 면역세포수는 $23.3 \pm 3.3 (\times 10^6)$ 로 증가되었으며, ECR을 200 mg/kg으로 투여한 실험군의 면역세포수는 $18.4 \pm 2.1 (\times 10^6)$ 로 유의성있게 감소되었으며 ($p < 0.01$), ECR을 100 mg/kg으로 투여한 실험군의 면역세포수는 $19.7 \pm 2.2 (\times 10^6)$ 로 유의성있게 감소되었다 ($p < 0.05$).

혈청 내 염증성 사이토카인 발현량을 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 사이토카인 발현량이 유의성있게 증가되었고, ECR 투여 실험군에서는 IL-1beta, IL-6 및 TNF-alpha 발현량이 각각 유의성있게 감소되었다(Fig. 6).

IV. 고 찰

仙茅는 수선화과(Amarylidaceae)에 속하는 다년생 초본인 仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn.의 뿌리줄기이다^{9,10}. 仙茅는 性味が 辛溫하고⁹, 小毒을 지니고 있다⁹. 仙茅는 補腎陽, 溫脾陽, 強筋骨, 祛寒濕하는 효능을 지니고 있어서, 주로 陽痿精冷, 筋骨痿軟, 腰膝冷痺, 陽虛冷瀉, 小便頻數, 遺尿, 遺精, 崩漏, 복통, 설사, 筋骨不建, 寒濕痺痛의 증상을 치료한다^{9,10}.

그런데, 仙茅는 小毒이 있어서⁹, 약간의 부작용이나 독성 반응을 일으킬 수 있으므로¹⁴, 임상에서 활용할 경우에 주의할 필요가 있는 한약재로 알려져 있다. 仙茅의 약리작용으로는 항혈전 효과¹⁵, 면역증강효과^{16,17}, 골조직 신생 및 골 치유효과¹⁸, 항B형 간염 바이러스효과¹⁹가 알려져 있다. 또한 仙茅는 초대 배양한 난포의 과립막 세포에서 estradiol(E₂)의 농도를 증가시키고²⁰, 사람에서 채취한 정자의 운동성을 증가시킨다²¹.

仙茅의 성분에 관한 연구를 살펴보면, 仙茅 사포닌은 대식세포의 增生 능력과 食食作用을 촉진하며, 면역 기능을 증가한다¹⁰. 그 외에 약침에 관한 연구로는 足三里에 대한 仙茅 약침이 골관절염에 효과가 있음이 입증되었다²².

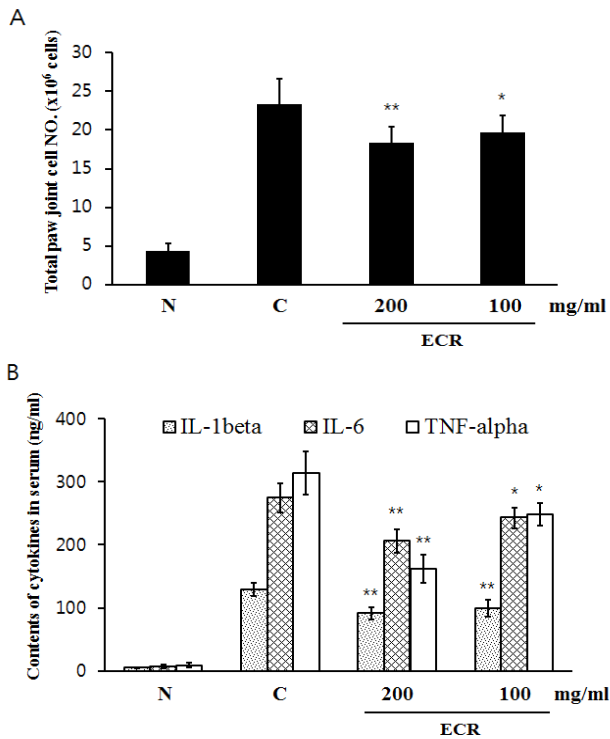


Fig. 6. Effects of total paw joint cell number and cytokines (IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha) levels in CIA Murine DBA/1J mice. Mice were immunized with 100 µg of CII on days 0 and 14. Each sample group was orally administrated of ECR (p.o, 200 mg/kg) or ECR (p.o, 100 mg/kg) for 42 days beginning on the day after the first immunization.

The cell was harvested from measurement taken the day after the final drug treatment. Each point represents the mean ± S.E of 10 mice. Statistically significant value was compared with control data by Student's t-test (*p<0.05 and **p<0.01).

한의학에서는 關節炎을 歷節風, 鶴膝風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 痛痺, 痺痛, 痺證, 痺症, 風痺, 痛痺 등의 범주에 속한다고 본다¹¹⁾. 關節炎은 食傷, 勞倦, 痰飲, 瘀血 등으로 氣血이 부족하고, 正氣가 허약해진 상태에서, 風寒濕熱의 邪氣가 침입하여 발생하며¹²⁾, 關節염의 치료방법으로는 實證의 경우에는 주로 祛風, 散寒, 除濕, 溫通經脈, 清熱, 化痰祛痰, 活血通絡 등의 방법을 활용하고 있으며, 虛證의 경우에는 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝, 補肝腎 등의 방법을 활용하고 있다^{11,12,13)}.

Collagen induced arthritis(CIA)는 류머티스 관절염이 발병하였을 때 나타나는 증상과 유사한 증상을 나타내게 되므로, 류머티스 관절염 동물실험의 모델로 개발되어 면역학적 기전과 치료 약물의 약리효과를 밝히는데 많이 이용되는 방법이다⁵⁾. CIA는 류머티즘 관절염과는 달리, 발병기간이 짧고, 피하결절, 폐섬유증과 같은 합병증이 없으며, rheumatoid factor가 검출되지 않는 차이가 있지만^{8,23)}, TNF-α, IL-1, IL-6 등의 염증관련 cytokines는 CIA 진행에 중요한 역할을 한다^{8,23)}.

이에 저자들은 補腎陽, 強筋骨, 祛寒濕하는 효능을 지니고 있는 仙茅가 만성 痺痛과 寒濕性 痺痛에 임상에서 활용되고 있는 점에 착안을 하고, 류머티스성 관절염에서 효능을 발휘할 수 있을 것으로 생각하였으며, 또한 어떤 기전을 지니고 효능을 발휘하고 있는 지 CIA 실험 모델을 활용하여 살펴보았다.

먼저, 仙茅 열수 추출물의 세포독성에 대한 영향을 살펴본 결과, 최대 200 µg/ml 처리 시에도 세포 독성은 나타나지 않

았다(Fig. 1).

NO(nitric oxide)는 Isoenzymes인 NO 합성효소(NOS)에 의한 L-arginine의 산화에 의해 형성된다^{24,25)}. 다양한 세포에서 proinflammatory agents에 반응하여 iNOS의 활성이 증가하면 과도한 염증반응이나 shock를 일으킨다^{24,25)}. 대식세포 NO 생성 억제 효능 평가 실험에서는 선모 열수 추출물을 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 200 µg/ml 처리 시 NO 생성 억제능은 대조군에 비해 유의성 있는 억제 효능이 나타났으며, 농도 의존적으로 억제 효능이 우수하였다(Fig. 2). 따라서, 이 실험에서 仙茅 열수 추출물의 CIA에 대한 우수한 효과는 일부 항산화효과에 의하여 매개된 것으로 판단해 볼 수 있다.

TNF-α는 상위 cytokine으로서, 세포성 면역을 활성화하고, 항체 생성을 촉진하는 IL-2, IL-6과 같은 하위염증매개물질의 생성기능을 증가시켜 염증을 증폭시킨다²⁶⁾. IL-1은 면역반응에 중요한 역할을 하는데, 여기에는 막 부착형인 IL-1α와 세포의 분비 형태인 IL-1β의 두 가지가 있다²⁷⁾. IL-1β는 TNF-α에 의해 생성되어서, 연골과 활막세포로부터 prostaglandin E₂, NO를 포함한 다른 염증 매개체를 생산하고, MMPs의 발현을 자극하여서 골관절염에서 연골분해를 일으킨다^{28,29)}. 염증반응의 경우에 분비되는 친염증성 cytokine인 IL-6은 helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되어 면역반응을 조절하고, 조혈, 염증을 조절한다³⁰⁾. 인체에서 염증반응이 진행되면, PGE₂와 같은 염증 매개물이 과도하게 생성되어 그 반응을 가속화 시키고, 활성화된 대식세포는 COX(cyclooxygenase)-2를 활성화시켜 과량의 prostanoid를 생성하여 면역반응에 관여함으로써, 다양한 염증성 질환의 원인이 된다^{31,32)}. 본 실험에서 RAW264.7 대식세포 싸이토카인 생성에 대한 억제 효능을 살펴보면, ECR은 200 mg/kg 仙茅 열수 추출물의 투여군에서 대식세포의 염증성 싸이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-12 발현량을 유의성 있게 감소시켰고, prostaglandin E₂ 생성량을 유의성 있게 감소시켰다. 100 mg/kg 仙茅 열수 추출물의 투여군에서는 IL-6, IL-12의 발현량을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3). 이러한 실험 결과로 볼 때, 仙茅의 처리는 inflammatory cytokines의 분비를 현저히 억제함을 알 수 있어서, 류머티스 관절염에서 초래되는 과도한 면역반응을 억제하는 immunomodulatory 효과에 의해 관절 손실을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

콜라겐 유발 관절염 모델에서는 real-time RT-PCR을 이용하여 mRNA 발현을 측정된 결과, mRNA 발현이 증가한다³³⁾. 본 실험에서 ECR은 농도 의존적으로 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 mRNA의 발현을 유의성 있게 감소시켰다. PGE₂는 염증반응 시 많은 염증세포들로부터 분비되어 혈관확장, 발열 및 통증을 유발하는 중요한자가 되며, 류마티스 관절염에서 증가된다³⁴⁾. 특히 adjuvant 유발관절염에서 내인성 PGE₂는 IL-6 같은 cytokine의 생산을 자극한다³⁵⁾. 류머티스 관절염 환자의 활막세포에서 신생혈관 생성에 MAPK(ERK; MAP kinase)와 AP-1(activator protein-1)의 신호체계가 중요하다³⁶⁾. ERK1/2, JNK, p38 MAPK는 대표적인 염증신호전달분자로서, LPS와 같은 염증자극에 의해서 염증전사인자인 NF-κB를 핵 내로 이동시켜서 염증반응을 일으켜서 NO, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6과 같은 염증성 물

질의 합성과 분비를 유도한다³⁷⁾. 또한 류머티스 관절염 환자의 활막세포에서는 iNOS, COX2의 활성이 증가한다³⁸⁾. 본 실험에서 콜라겐 유발 관절염 모델에서는 JNK, ERK, iNOS, COX2, IL-1 β 및 TNF- α 단백질 발현량이 LPS를 처리한 대조군에서는 증가되었으나, ECR은 농도 의존적으로 단백질 발현량을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4).

콜라겐 유발 관절염에서는 관절염 지수(AI)가 증가된다¹³⁾. 이 실험에서 콜라겐 유발 관절염 생쥐의 관절염 지수(AI)를 측정된 결과, ECR을 200 mg/kg과 100 mg/kg으로 투여한 실험군의 AI는 모두 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 仙茅 약물 처리로 인해 관절염의 악화가 진행되지 않았음을 의미한다.

CIA 실험 모델에서, paw joint에서 면역세포의 수는 대조군에서 현저하게 증가하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. 본 실험에서도 족관절 면역세포수는 CIA 모델에서 현저하게 증가하였으나, ECR은 200 mg/kg과 100 mg/kg 투여군 모두에서 족관절 부위 면역세포수를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 6). 류머티스 관절염은 전신적 면역체계의 활성화에 의해서 발생하며, CIA 실험 모델에서 혈청 중의 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성이 현저하게 증가한다^{40,41)}. 본 실험에서는 ECR 200 mg/kg과 100 mg/kg 투여군 모두에서 혈청 내 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 사이토카인 분비량을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 6).

이상의 실험 결과에서, 100 mg/kg 이상의 仙茅 熱水 추출물은 immune modulatory 작용에 의해서, CIA를 매우 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었으므로, 향후 생리활성을 나타내는 성분의 규명과 다양한 약효기전의 연구를 통하여, 새로운 류머티스 관절염 치료제로서 개발에 仙茅를 적극적으로 활용해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

仙茅 熱水 추출물의 대식세포에 대한 항염증 효과와 콜라겐유발 관절염 유발에 대한 효능 연구를 위해, 염증성사이토카인 발현량 분석, mRNA 발현량 및 단백질 분석과 관절염 지수, 관절 내 면역세포수 분석 및 혈청 내 염증성 사이토카인 발현을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. ECR은 대식세포의 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-12 발현량을 유의성 있게 감소시켰고, prostaglandin E2 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
2. ECR은 염증성 mRNA 및 단백질 발현량을 유의성 있게 감소시켰다.
3. ECR은 콜라겐 유발 생쥐의 관절염 지수를 유의성 있게 감소시켰다.
4. ECR은 족관절 부위 면역세포수를 유의성 있게 감소시켰으며, 혈청 내 혈청 내 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의

사이토카인 분비량을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로, 仙茅 熱水 추출물은 항염증 효능이 우수하며, 이를 통해 대식세포에 대한 항염증 효과와 콜라겐 유발 관절염에 대한 치료 효능을 통해 향후 관절염 치료제로서 개발 가능성이 있다고 판단된다.

참고문헌

1. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2591-602.
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011 ; 365 : 2205-19.
3. Cheon YH, Kim HO, Suh YS, Hur JH, Jo WY, Lim HS, et al. Inhibitory Effects for Rheumatoid Arthritis of Dietary Supplementation with Resveratrol in Collagen-induced Arthritis. *J Rheum Dis.* 2015 ; 22(2) : 93-101.
4. Son KM, Jung YO, Kim IJ, Kim BJ, Lee SY, Mun SY, et al. Clinical characteristics of Korean rheumatoid arthritis patients with indications for TNF- α blocker. *J Rheum Dis.* 2013 ; 20 : 356-60.
5. Kim DH, Song BK, Kim HK. Effect of Moutan Cortex on Collagen-induced Arthritis. *The Journal of Traditional Korean Medicine.* 1997 ; 7(2) : 60-9.
6. Wooley PH. Collagen-induced arthritis in the mouse. *Methods Enzymol.* 1988 ; 162 : 361-73.
7. Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA, Townes AS. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol.* 1992 ; 89(2) : 244-50.
8. Durie FH1, Fava RA, Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 ; 73(1) : 11-8.
9. The textbook compilation committee of Korean herbology. *Korean herbology.* Seoul : Younglimsa, 2011 : 598-600.
10. Seo BI, Ju YS, Choi HY, Park JH, Roh SS, Koo JS, Kim JJ, Kim DY. Illustrated book of herbal plants in oriental medicine. Daegu : Daewondang. 2011 : 102-3.
11. Jung-Hyun Cho, O-Gon Kwon, Chang-Hoon Woo, Hee-Duk An. Suppress Effects of Euiiin-tang (yiyiren-tang) Aqueous Extracts on Collagen Induced Arthritic(CIA) DBA/1 Mice. *J Oriental Rehab Med.* 2010 ; 20(1) : 37-60.
12. Shin MK, Roh SS, Seo YB. Research on Effects of Cordyceps Sinensis in Collagen Induced Arthritis Mouse Model. *Kor. J. Herbology.* 2007 ; 22(3) : 57-65.
13. Roh SS, Ku SK, Seo YB. Effects of Mori Ramulus on Collagen-induced Arthritis Rat(Expression of Immunocells in Draining Lymph Node). *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2009 ; 23(5) :

- 1106-15.
14. Ji-ha Park, Bu-Il Seo. A philological study on poisoning of *Curculiginis Rhizoma*. *JOMA*. 2010 ; 8(1) : 33-9.
 15. Seong-Soo, Roh. Effects of *Curculiginis Rhizoma* on anti-thrombotic activity. *Kor. J. Herbology* 2011 ; 26(4) : 125-132.
 16. Park JH, Seo YB. Immunopharmacologic studies about Drugs for Tonifying Yang. Study of Oriental college research center in Daejeon university. 2000 ; 9(1) : 215-223.
 17. Lakshmi V, Pandey K, Puri A, Saxena RP, Saxena KC. Immunostimulant principles from *Curculigo orchiodes*. *J. Ethnopharmacol.* 2003 ; 89(2-3) : 181-184.
 18. Wong RWK, Rabie B, Bendeus M, Hagg U. The effects of *Rhizoma Curculiginis* and *Rhizoma Drynariae* extracts on bones. *Chinese Medicine*. 2007 ; 2(13) : 87-93.
 19. Mi S. A research for screening antihepatitis B virus drugs with the 2,2.15 cell line. *ZhonghuaYiXueZaZhi*. 1992 ; 72(10) : 612-615,640.
 20. Dong BF, Fang ZQ, Shi JR. Effect of *erxiandecoction* and its subdivisions on granulosacells secretory function in rats. *ZhongguoZhongXiYiJieHeZaZhi* 2006 ; 26 : 122-125.
 21. Peng SJ, Lu RK, Yu LH. Effects of *semen Cuscutae*, *rhizoma Curculiginis*, *radix Morindae officinalis* on human spermatozoan's motility and membrane function *in vitro*. *Zhongguo Zhong XiYiJie He Za Zhi* 1997 ; 17(3) : 145-147.
 22. Min Jung Ji, Seong Chul Lim, Jae Soo Kim, Hyun Jong Lee and Yun Kyu Lee. Effects of *Curculiginis Rhizoma* Pharmaco-Acupuncture at ST36 on Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats. *The Acupuncture*. 2015 ; 32(1) : 53-66.
 23. Takai Y1, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hamaoka T, Fujiwara H. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1989 ; 32(5) : 594-600.
 24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 ; 6(12) : 3051-64.
 25. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*. 1996 ; 51(4) : 383-94.
 26. Isaacs A. Lymphokines and cytokines. In : immunology an introductin(Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia : Saunders. 1995 : 155-69.
 27. Unanue ER. The mononuclaeer-phagocytic system. In : immunology an introductin(Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia : Saunders. 1995 : 61-74.
 28. Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, Polanska M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007 ; 38(3) : 151-6.
 29. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum*. 2001 ; 44(9) : 2078-83.
 30. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. *J Korean Oriental Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2010 ; 23(1) : 118-34.
 31. Murakami, M., Kudo, I. Prostaglandin E synthase : a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 12(8) : 943-954, 2006.
 32. Blanco, J.C., Contursi, C., Salkowski, C.A., DeWitt, D.L., Ozato, K., Vogel, S.N. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J. Exp. Med*. 2000 ; 191(12) : 2131-2144.
 33. Lee JH, Kim GT, Ryu S, Kim JI, Baek SH, Kim SI. Synovial RANKL/OPG mRNA Ratio and Effect of IL-17 in Experimental Rheumatoid Arthritis Model. *J Rheum Dis*. 2006 ; 13(2) : 123-131.
 34. Lee JS, Kim KH, Lee SD, Kim KS. The Effect of *Clematidis Radix* Herbal-acupuncture Solution, on Collagen, Adjuvant, Lipopolysaccharide and Phospholipase A2 Induced Rheumatoid Arthritis in Mice. *The Acupuncture*. 2012 ; 29(1) : 127-37.
 35. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production *in vivo*. *J Exp Med*. 1996 ; 184(3) : 883-91.
 36. Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, et al. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002 ; 46 : 1202-9.
 37. Park HJ, Bae GS, Kim DY, Seo SW, Park KB, Kim BJ, et al. Inhibitory Effect of Extract from *Ostericum koreanum* on LPS-induced Proinflammatory Cytokines Production in RAW264.7 Cells. *Kor. J. Herbol*. 2008 ; 23(3) : 127-134.
 38. Seo HG, Oh MS, Kim DH. Immunity Responses of the *Spatholobus Suberectus* Dunn to the Synovial Cells Isolated from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Oriental Physiology & Pathology*. 2003 ; 17(3) : 780-6.
 39. Park DJ, Lee YC, Lee JC. Inhibitory Effect of a decoction composed of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. and *Chaenomeles sinensis* Koehne and its component herbal medicines on Collagen II-induced Arthritis Mice. *Kor. J. Herbology* 2014 ; 29(4) : 35-44.
 40. Kang SY, Jin MR, Choi JJ, Koo YS, Roh SS, Kim

- DH. Suppressive Effects of Haedongpi-san, a Traditional Herbal Medicine, on Collagen-induced Arthritis in Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2007 ; 21(4) : 982-91.
41. Sim BY, Choi HJ, Bak JW, Kim DH. Effects of GamiBangkeehwangkee-tang (fángjǐhuángqíq-tāng) ethanol extract on Collagen-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. *Kor. J. Herbology* 2014 ; 29(6) : 95-102.