

두충 추출물의 류마티스관절염 동물모델에 대한 개선 효과

지중구[†]

중부대학교 한방보건제약학과, 교수
(2022년 1월 25일 접수: 2022년 2월 24일 수정: 2022년 2월 24일 채택)

Improvement Effect of the *Eucommia ulmoides* Extracts on CIA-induced Rheumatoid Arthritis Animal Models

Joong-Gu Ji[†]

Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University
(Received January 25, 2022; Revised February 24, 2022; Accepted February 24, 2022)

요약 : 본 연구는 CIA에 의해 유발된 DBA/1 마우스를 통해 류마티스관절염 바이오마커에 대한 두충 추출물의 효과를 평가하였다. 평가를 위해 류마티스관절염 동물모델 제작 후 100 mg/kg/day로 4주간 경구 투여하고 혈청 바이오마커, 방사선, 구조적 매개변수 분석을 통해 치료 효과를 확인하였다. 음성대조군과 비교하여, 두충 추출물은 염증 및 면역글로불린 마커(TNF- α , IgG 및 hs-CRP)의 생성을 유의하게 감소시켰고, 백혈구의 단핵구 수를 유의적으로 감소시켰다. 또한, 두충 추출물은 관절 파괴를 효과적으로 보존하고 관절 변형을 줄였으며, 골 밀도의 증가와 유의적으로 골 염증을 감소시켰다. 이러한 결과는 두충 추출물이 류마티스관절염 증상을 개선하는 것을 나타낸다. 따라서, 두충 추출물은 류마티스관절염 관리를 위한 새로운 치료 옵션이 될 수 있음을 보여준다.

주제어 : 관절, 두충, 류마티스관절염, 자가면역 및 염증성 질환, 의약품 소재

Abstract : The present study aimed to evaluate the effect of *Eucommia ulmoides* extracts on rheumatoid arthritis biomarker in a CIA-induced DBA/1 mice. For evaluation, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at dose of 100 mg/kg/day for 4 weeks after production of an animal model of rheumatoid arthritis and we confirmed the treatments' effects based on serum biomarker, radiological, structural parameter analysis. Compared to the negative control group, the *Eucommia ulmoides* extracts treatments significantly reduced the serum level of inflammation and immunoglobulin markers (i.e., TNF- α , IgG, and hs-CRP), and significantly decreased the monocyte count of white blood cells. Furthermore, the *Eucommia ulmoides* extracts treatments effectively preserved the joint destruction, and little the joint deformation. Moreover, compared to the negative control group, the *Eucommia ulmoides* extracts treatments increased the bone volume, and significantly decreased bone inflammation. The results indicate that the *Eucommia ulmoides*

[†]Corresponding author
(E-mail: jjg1970@joongbu.ac.kr)

extracts improved rheumatoid arthritis symptoms. Thus, the *Eucommia ulmoides* extracts may be a novel therapeutic option for the management of rheumatoid arthritis.

Keywords : autoimmune and inflammatory disease, *Eucommia ulmoides*, joint, rheumatoid arthritis, therapeutic option

1. 서론

류마티스관절염(Rheumatoid arthritis)은 관절 활막염과 연골 및 조직 손상에 의한 골 파괴와 골 감소를 특징으로 하는 만성 자가면역질환으로 전 세계 성인인구의 1%의 환자가 고통받고 있다 [1-3].

이와 같은 류마티스관절염은 비약적인 생명공학 발전을 기반으로 다양한 병인 연구를 통해 CD4+ T 세포의 기능인 Th1/Th2 패러다임 이외에도 새로운 세포군으로 알려진 T helper 17 (Th17)에서 분비되는 IL-17, IL-23와 같은 사이토카인이 신규 치료 표적 바이오마커로 주목받게 되었다[4-6]. 이로 인해 초기 표적치료제인 종양괴사인자(TNF) 억제제, 인터루킨(IL)-6 억제제 개발 이후 최근에는 세포 내 염증성 사이토카인의 신호전달물질인 야누스 인산화효소(Janus kinase)를 표적으로 하는 소분자 억제제가 승인되어 경구 용법을 통한 다양한 종류의 소분자 억제제의 활용 가치가 매우 높아졌다[4]. 다만, 류마티스관절염 시장에서는 생물학적제제 및 소분자 억제제 사용에 있어 고비용과 더불어 감염 발생(결핵)의 안전성과 표적 치료 떨어질 수 있다는 문제점이 해소되지 않아 이를 해소할 수 있는 천연물 소재에 관한 연구가 현대의학 및 한의학계에서도 주목받고 있다[4,7]. 따라서 류마티스관절염 치료제의 주요 기전인 TNF- α , IL-6, IL-17 등과 같은 사이토카인의 억제와 더불어 임상적 증상인 관절 이상에 효과적인 천연물 소재 치료제는 조기 진단에 의한 약물치료를 통해 관절 변형 예방과 치료결과 향상이라는 결과가 수반되어 사회, 경제적으로 환자의 부담을 완화할 수 있다.

본 연구에서 사용한 두충(*Eucommia ulmoides*)은 두충과의 낙엽 지는 큰키나무인 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)의 나무껍질로써 syringaresinol, Pinoresinol, Cycloolivil, Medioresinol, eucommin A 등의 성분을 기반으로 혈압 강화, 진정, 항염, 면역 증강, 항암 등의

약리 작용이 있어, 근육과 골질을 강화하고 안테 작용을 하므로 요통, 슬관절염, 골다공증 등에 적용하고 성장 촉진, 유산 방지 등의 효능이 있다고 알려져 있다[8]. 류마티스관절염과 연관된 국내 연구에서 항염증 효능을 비롯하여 뼈모세포의 증식과 세포자멸사 억제, 뼈 파괴 세포의 생성 억제, IGF-1 농도와 성장판의 연골 형성을 증가 등의 연구와 발효우슬, 당귀와의 복합추출물의 항골관절염 및 항관절통 효과에 관한 결과가 보고 되었으며[9-15], 현재 한의학 임상에서는 우슬, 오가피, 방기 등의 한약재와 함께 류마티스관절염 처방으로 활용되고 있으나 치료 소재로서의 단독 후보군 연구는 진행된 바가 없다.

따라서 신규 치료 소재로서의 기초적 자료를 제공하고자 두충 추출물을 collagen으로 류마티스관절염 모델을 제작하여 경구 투여 후 류마티스관절염에 관한 기전 중 IL-6, IL-17, TNF- α 등의 사이토카인 생성량과 hs-CRP 검사 및 면역 관련 매개체 등의 혈액 변화와 방사선 분석을 통한 임상적 증상 개선을 확인하였기에 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 추출

본 연구에 사용된 두충(*Eucommia ulmoides*)은 경상북도 하양에서 작업한 약재를 (주)옴니허브에서 구매하여 사용하였다.

추출은 두충 50 g에 DW 500 ml을 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 이후 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 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.), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Indomethacin (Sigma Co., U.S.A.), Mouse IgG ELISA kit (eBioscience CO., U.S.A.) 등을 사용하였다.

기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2.3. 실험동물 및 사육

실험동물인 수컷 5주령의 DBA/1 mouse (20~23 g)는 (주)라온바이오에서 공급받아 실험 당일까지 고품사료와 식수를 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 동물 실험 윤리위원회의 승인(승인 번호-DJUARB 2020-035)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험하였다.

2.4. 류마티스관절염 유발 및 그룹 배분

2 mg/ml 농도의 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA)와 1:1의 비율로 혼합하며, 혼합액 0.1 mL (제2형 콜라겐 100 µg)을 꼬리의 기저부에서 1.5~3 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하여 1차 유발을 하였다. 1차 유발 후 2주 후에 1차 시기와 동일하게 CFA 대신 incomplete Freund's adjuvant (IFA)과 혼합하여 한쪽 발바닥에 주사하여 유발하였다.

실험은 류마티스관절염을 유도하지 않고 자유 식이를 하는 정상군(이하, Normal), 류마티스관절염 유도 후 증류수를 투여하는 음성대조군(이하, Control), 2.5 mg/kg/day의 indomethacin을 투여하는 양성대조군(이하, Indo) 및 두충 추출물을 100 mg/kg/day로 투여하는 실험군(이하, EUD) 등 총 4개 그룹으로 나누었으며, 그룹 당 실험동물은 8마리씩 설정하였다. 투여 액량은 체

중에 따라 10 ml/kg으로 설정하여 2차 유발 후부터 4주간 경구 투여하였다.

2.5. 혈액 및 조직 분리

실험 종료 후 심장에서 채혈한 혈액 중 면역세포 수 분석을 위한 전혈은 EDTA 튜브에 담고 남은 혈액을 30분간 상온에서 굳혀 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하였다.

방사선 분석을 위한 류마티스관절염을 유도한 후족부의 시편을 사후 경직이 일어나기 전 최대한 발가락을 편 후, 10% 포르말데히드 용액에 고정하였다.

2.6. 사이토카인 생성량 측정

분리한 혈청으로 IL-6, IL-17, TNF- α 농도는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각 well에 50배 희석한 혈청 25 µl씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25 µl씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이를 다시 25 µl의 detection antibody를 가하여 1시간 동안 실온에서 암소 반응시키고 추가로 25 µl의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150 µl 넣고 5분간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하였다.

2.7. Immunoglobulin G (IgG) 생성량 측정

분리한 혈청으로 IgG 생성량의 측정은 ELISA kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 항체를 coating 완충 용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight 하였다. 각 well은 3회 washing 완충 용액으로 세척한 후 50배 희석한 혈청을 100 µl씩 분주하였다. 이를 1시간 동안 실온에서 반응하고 washing 완충 용액으로 2회 세척한 다음, avidin-HRP conjugated antibody 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 반응시킨 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 반응시킨 다음 50 µl의 Stop solution을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 면역 세포 수 및 hs-CRP 분석

분리한 전혈(단핵구-대식세포)과 혈청(hs-CRP)을 분석하기 위해 검사 기관인 KPNT (Korea)에 의뢰하였다.

2.9. 방사선 분석

분리 후 포르말린에 고정된 후속부를 검사 기관인 KPNT (Korea)에 Micro-CT 촬영 및 Structural Parameter를 의뢰하였다. Micro-CT 촬영은 후속부 전체를 촬영한 후 3D 작업을 진행하였으며, Structural Parameter 측정은 중족골을 기준으로 BV (bone volume)와 BS (bone surface)에 대한 ratio를 산출하여 관절의 염증 정도를 나타내었다.

2.10. 통계처리

모든 실험 결과는 평균값±표준편차(mean±S.D)로 표시하였다. 그룹별 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 사이토카인 생성량

류마티스관절염의 병리적 기전의 주된 특징은 사이토카인 생성량 증가가 나타나게 된다. 일차적으로 관절 내 활막조직 세포의 활성화와 염증세포의 침윤을 통해 대식세포가 IL-6, IL-17, TNF- α 등과 같은 사이토카인이 생성되며 관절 내 염증반응을 증폭시키게 된다[16-18]. 그 결과, 연골 파괴와 관절의 변형과 기능 파괴 등을 초래하는 것으로 알려져 있는데, 이는 많은 임상 결과를 통해 류마티스관절염 환자의 혈액과 활액에서 IL-6, IL-17, TNF- α 등의 염증성 사이토카인이 높은 것으로 보고되었고 현재 치료제로 사용되는 IL-6, TNF- α 억제제가 이를 근거로 사용된다는 점에서 볼 때 사이토카인 생성 억제는 예방과 치료에서 중요한 바이오마커임을 보여주고 있다[19-21].

두충 추출물이 류마티스관절염의 대표적 사이토카인 생성량 억제를 확인한 결과, 음성대조군 대비 IL-6, IL-17 생성량 억제에는 큰 차이를 보이지는 않았으나(Fig. 1-A, B), TNF- α 생성은 약 32% 정도의 유의적인 감소가 나타났

(Fig. 1-C). 이와 같은 결과는 김유현과 박호[22]가 보고한 관절염 치료에 사용되는 한약재에 관한 항염증 연구 결과와 이부균 등[23]이 collagen II로 유도한 관절염 생쥐에서 두충과 속단 복합물이 TNF- α 생성을 억제했다는 점에서 두충 추출물이 류마티스관절염 개선을 위해 TNF- α 억제제 소재로서의 가능성을 보여주고 있다.

3.2. IgG 생성량

인체에 침투한 물질에 대항하는 당단백질인 IgG는 면역반응에 주요 역할을 수행하며, 이차 면역에서 보체 연쇄 반응을 통해 대식세포의 식균작용을 돕는 것으로 알려져 있다[16]. 특히, 사이토카인과 함께 류마티스관절염 진단 매개체로 IgG가 사용되는 이유는 자가 항체의 일종인 류마티스 인자(Rheumatoid factor, RF)와 cyclic citrullinated peptide에 대한 항체(항CCP 항체)가 류마티스관절염의 진단과 병인에 중요하다고 알려져 있기 때문이다[16].

두충 추출물의 IgG 생성량 억제를 확인한 결과, 음성대조군 대비 약 25% 정도의 유의적인 감소가 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 이부균 등[23]이 collagen II로 유도한 관절염 생쥐에서 두충과 속단 복합물이 IgG 생성을 억제하지 않았다는 결과와는 상반되는 결과가 도출되었다. 이는 본 연구 결과의 두충 효능을 기반으로 저하된 원인이 속단과의 배합을 통한 반감 또는 원산지 차이에 의해 발생한 결과인지는 추후 연구가 필요한 부분으로 남아있지만, 본 연구에서의 두충은 TNF- α 및 IgG 생성을 억제함에 따라 류마티스관절염에 효능을 나타낼 수 있는 천연물임을 보여주고 있다.

3.3. 대식세포 수 및 hs-CRP 검사

류마티스관절염 환자는 관절 내 존재하는 항원 단백질에 반응하는 자가항원반응성 T세포가 지속적인 활성화로 인해 대식세포가 활막세포와 함께 관절 염증을 증폭시키게 된다[16-18]. 이로 인해 대식세포가 생성하는 물질인 사이토카인의 국소적 생산물이 류마티스관절염의 병리, 임상적 양상의 주된 원인이 되고 있어 대식세포 수의 감소는 만성 자가면역질환의 개선에 중요한 면역 세포로 알려져 있다[24].

또한, hs-CRP 검사는 염증 및 자가 면역질환과 관련된 질환을 판단하는 임상적 검사 중 하나로써 염증이나 조직 손상에 반응하여 양이 증가

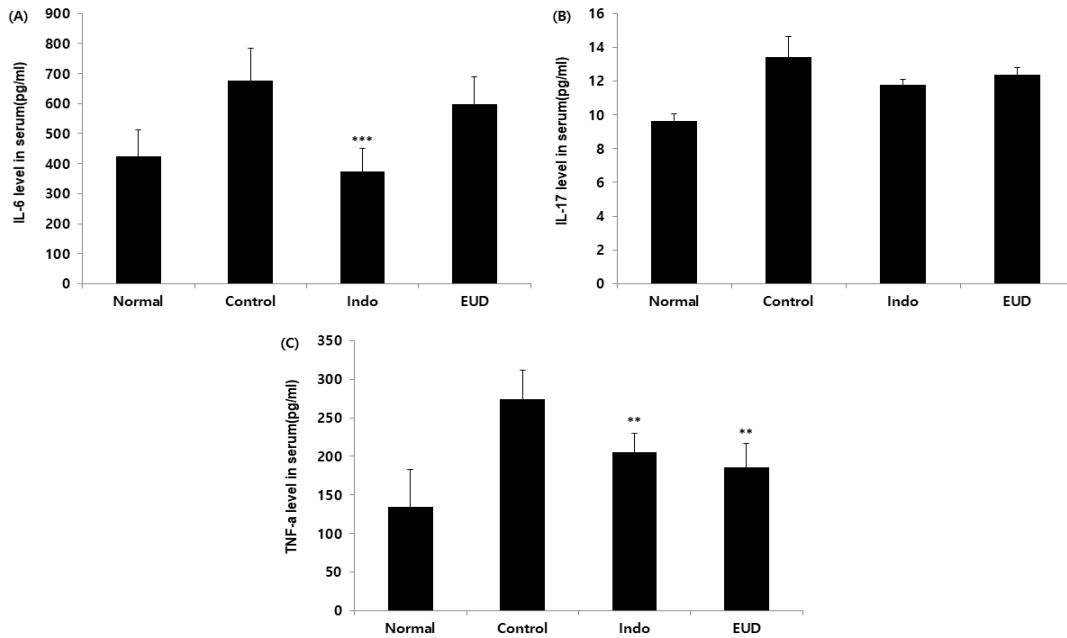


Fig. 1. Effects of *Eucommia ulmoides* extracts on IL-6(A), IL-17(B), and TNF- α (C) level in CIA-induced DBA/1 mice. The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 8$ /group). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ indicates a significant difference from the control group. Normal, non treatment group; Control, rheumatoid arthritis group; Indo, indomethacin was administered orally at doses of 2.5 mg/kg/day; EUD, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at doses of 100 mg/kg/day.

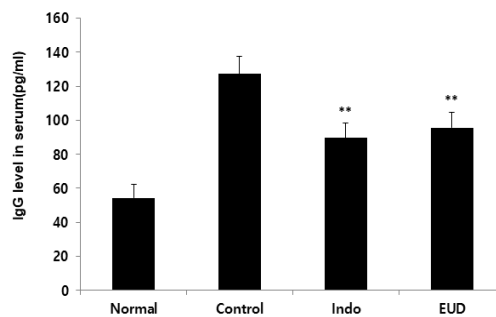


Fig. 2. Effects of *Eucommia ulmoides* extracts on IgG level in CIA-induced DBA/1 mice. The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 8$ /group). ** $p < 0.01$ indicates a significant difference from the control group. Normal, non treatment group; Control, rheumatoid arthritis group; Indo, indomethacin was administered orally at doses of 2.5 mg/kg/day; EUD, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at doses of 100 mg/kg/day.

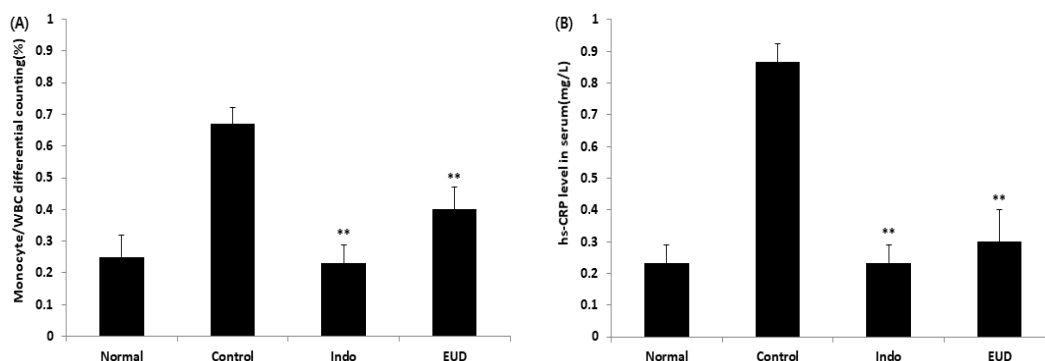


Fig. 3. Effects of *Eucommia ulmoides* extracts on monocyte counting(A), and hs-CRP(B) level in CIA-induced DBA/1 mice. The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 8/\text{group}$). ** $p < 0.01$ indicates a significant difference from the control group. Normal, non treatment group; Control, rheumatoid arthritis group; Indo, indomethacin was administered orally at doses of 2.5 mg/kg/day; EUD, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at doses of 100 mg/kg/day.

하는 CRP(반응성 단백)를 정확히 검출하는 측정 방법이다[25]. 따라서 hs-CRP 수치의 저하는 만성 염증 상태인 류마티스관절염 해소의 지표로도 활용될 수 있다.

두충 추출물의 대식세포 수 및 hs-CRP 검사를 진행한 결과, 음성대조군 대비 대식세포 수는 약 43% 정도의 유의적인 감소가 나타났으며, hs-CRP 수치 역시 약 65% 정도의 유의적인 감소가 확인되었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 대식세포 수의 감소로 인해 염증성 사이토카인 TNF- α 의 감소 결과를 뒷받침하고 있으며, hs-CRP 수치가 낮아짐에 따라 두충 추출물이 류마티스관절염의 다양한 기전에서 염증 해소에 도움을 줄 수 있는 원료임을 시사하고 있다.

3.4. 방사선 및 structural parameter 검사

류마티스관절염의 관절 침범은 전신에 적용되나, 특징적으로 손과 발 관절에서 비세균성 만성 염증반응으로 인해 통증 및 부어오르는 증상이 나타나며, 원활한 치료가 진행되지 않으면 관절의 변형과 파괴, 골 염증에 의한 골 밀도 감소 등이 나타나게 된다[26,27]

두충 추출물의 방사선 촬영 후 3D 작업을 수행한 결과, 음성대조군 대비 중족지 관절과 근위부 관절의 변형 및 골 마디 사이의 파괴가 적게 나타났음이 확인되었다(Fig. 4). 또한, structural parameter 검사를 통해 골 염증 수치와 골 밀도

를 확인한 결과, 음성대조군 대비 골 염증 수치가 적고 골 밀도는 높은 것으로 나타났다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 앞서 혈액을 통해 진행한 류마티스관절염 관련 인자 및 hs-CRP 검사 결과를 기반으로 두충 추출물의 효능이 방사선, structural parameter 검사를 통해 더욱 명확하게 제시되고 있다.

4. 결론

본 연구는 두충 열수 추출물(이하, 두충 추출물)이 류마티스관절염 질환의 치료 소재로서 활용 가능성을 객관적으로 검증하고자 CIA로 류마티스관절염을 유도한 동물모델에 경구 투여한 후 혈액 분석(사이토카인, IgG, 대식세포 수, hs-CRP) 및 방사선, structural parameter 검사 등을 진행하였다.

음성대조군 대비 두충 추출물은 류마티스관절염 관련 매개체 중 염증성 사이토카인 TNF- α 의 생성과 면역글로불린 G (IgG) 생성, 대식세포 수, hs-CRP 수치 등을 유의적으로 감소시켰다. 또한, 방사선 검사를 통해 중족지 관절과 근위부 관절의 변형 및 골 마디 사이의 파괴가 적게 나타났다. structural parameter 검사를 통해 골 밀도의 증가, 골 염증의 감소가 확인되었다.

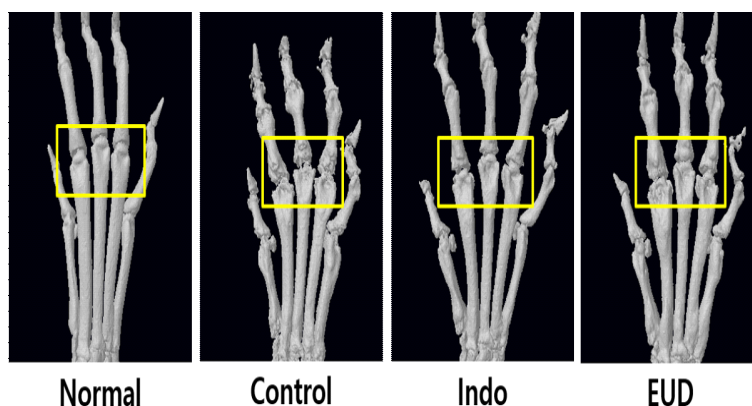


Fig. 4. Effects of *Eucommia ulmoides* extracts on the micro CT in CIA-induced DBA/1 mice. Representative morphological images of the right paw was obtained by three-dimension micro-computed tomography. Normal, non treatment group; Control, rheumatoid arthritis group; Indo, indomethacin was administered orally at doses of 2.5 mg/kg/day; EUD, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at doses of 100 mg/kg/day.

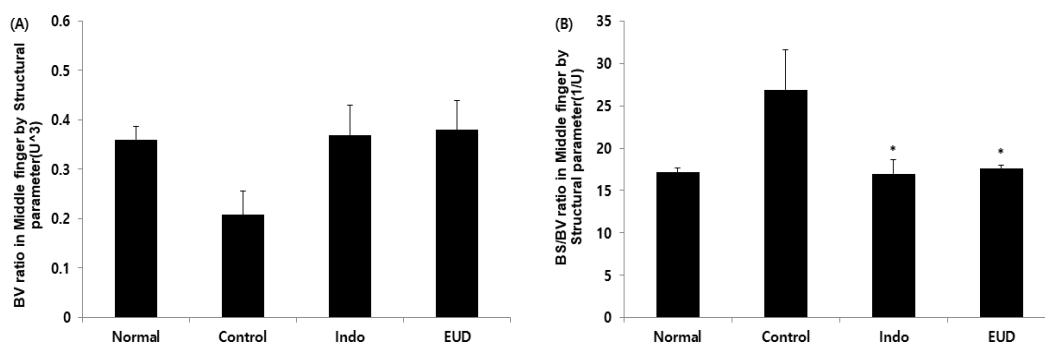


Fig. 5. Effects of *Eucommia ulmoides* extracts on bone volume(A), and bone surface/bone volume(B) ratio in CIA-induced DBA/1 mice. The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 8$ /group). * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the control group. BV; bone volume, BS; bone surface. Normal, non treatment group; Control, rheumatoid arthritis group; Indo, indomethacin was administered orally at doses of 2.5 mg/kg/day; EUD, *Eucommia ulmoides* extracts was administered orally at doses of 100 mg/kg/day.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 두충 추출물은 류마티스관절염 관련 인자인 사이토카인 및 면역 글로불린, 면역 세포 등의 결과가 염증과 면역반응 조절을 통한 병리적 진행 억제에 따른 임상적 증상인 관절 이상에도 효과적임이 확인되었다. 따라서 선행연구 및 본 연구 결과를 기반으로 볼 때 류마티스관절염을 비롯한 퇴행성관절염 역시 공통 인자가 작용하는 만큼 관절염에 효과적인 천연물 소재로서의 가치가 높을 것으로 판단된다.

References

1. S. Bae, I. Hong, O. H. Cho, "Influence of Anxiety, Depression and Self-Esteem on Quality of Life in Patients with Rheumatoid Arthritis". *Journal of Korean Academy of Fundamentals of Nursing*, Vol.28, No.2, pp. 165-173, (2021).

2. A. Beşirli, J. Ö. Alptekin, D. Kaymak, Ö. A. Özer, "The relationship between anxiety, depression, suicidal ideation and quality of life in patients with rheumatoid arthritis". *Psychiatric quarterly*, Vol.91, No.1, pp. 53-64, (2020).
3. I. B. McInnes, G. Schett, "The pathogenesis of rheumatoid arthritis". *New England Journal of Medicine*, Vol.365, No.23, pp. 2205-2219, (2011).
4. Y. K. Sung, "Advantages and disadvantages of targeted therapy in patients with rheumatoid arthritis". *Journal of the Korean Medical Association/Taehan Uisa Hyophoe Chi*, Vol.64, No.2. pp. 90-93, (2021).
5. D. E. Furst, P. Emery, "Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets". *Rheumatology*, Vol.53, No.9, pp. 1560-1569, (2014).
6. K. W. Kim, S. H. Lee, M. L. Cho, H. J. Oh, Y. J. Woo, S. H. Kim, H. R. Kim., "IL-17 and Toll-like Receptor 2 or Toll-like Receptor 4 Combined Engagement Upregulates RANKL and IL-6 in Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts", *The Journal of the Korean Rheumatism Association*, Vol.17, No.1, pp. 36-45, (2010).
7. S. S. Seong, C. B. Choi, J. H. Woo, K. W. Bae, C. L. Joung, W. S. Uhm, T. H. Kim, J. B. Jun, D. H. Yoo, J. T. Lee, S. C. Bae, "Incidence of tuberculosis in Korean patients with rheumatoid arthritis (RA): effects of RA itself and of tumor necrosis factor blockers". *The Journal of rheumatology*, Vol.34, No.4, pp. 706-711, (2007).
8. Ahn, DK. Illustrated guide to clinical medical herbs. pp.261-262, Hyeonamsa Publishers, (2012).
9. Y. H. Kim, H. Park, "Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of medicinal plants used in the treatment of arthritis". *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, Vol.48, No.3, pp. 176-182, (2016).
10. Y. J. Kim, W. Heo, H. S. Choi, K. S. Kang, G. S. Hwang, J. Y. Baek, B. A. Koo, H. Y. Kim, "Anti-inflammatory Effect of Eucommia Ulmoides Oliver Bark Extract on P. gingivalis LPS-induced YD-38 Cells". *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.50, No.3, pp. 185-190, (2019).
11. X. He, J. Wang, M. Li, D. Hao, Y. Yang, C. Zhang, R. He, R. Tao, "Eucommia ulmoides Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine". *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.151, No.1, pp. 78-92, (2014).
12. J. Lin, Y. J. Fan, C. Mehl, J. J. Zhu, H. Chen, L. Y. Jin, J. H. Xu, H. M. Wang, "Eucommia ulmoides Oliv. antagonizes H₂O₂-induced rat osteoblastic MC3T3-E1 apoptosis by inhibiting expressions of caspases 3, 6, 7, and 9". *Journal of Zhejiang University Science B*, Vol.12, No.1, pp. 47-54, (2011).
13. R. Zhang, Y. L. Pan, S. J. Hu, X. H. Kong, W. Juan, Q. B. Mei, "Effects of total lignans from Eucommia ulmoides barks prevent bone loss in vivo and in vitro". *Journal of ethnopharmacology*, Vol.155, No.1, pp. 104-112, (2014).
14. J. Y. Kim, J. I. Lee, M. K. Song, D. Lee, J. Song, S. Y. Kim, J. Park, H. Y. Choi, H. Kim, "Effects of Eucommia ulmoides extract on longitudinal bone growth rate in adolescent female rats". *Phytotherapy Research*, Vol.29, No.1, pp. 148-153, (2015).
15. D. H. Choi, S. J. Lee, H. C. Jeong, K. M. Kim, M. Y. Kwon, S. Lee, "Anti-osteoarthritis and anti-arthrodynia effects of a mixture of fermented achyranthes japonica Nakai, Angelica gigas Nakai, and Eucommia ulmoides Oliver extracts on monosodium iodoacetate-induced arthritis in rats". *Journal of the Korean Society of*

- Food Science and Nutrition*, Vol.48, No.11, pp. 1179–1185, (2019).
16. J. M. Kim, H. Y. Kim, "Pathogenesis of rheumatoid arthritis". *Journal of the Korean Medical Association*, Vol.53, No.10, pp. 853–861, (2010).
 17. M. L. Cho, C. H. Yoon, S. Y. Hwang, M. K. Park, S. Y. Min, S. H. Lee, S. H. Park, H. Y. Kim, "Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: Cross-talk between T cells and synovial fibroblasts". *Arthritis & Rheumatism*, Vol.50, No.3, pp. 776–784, (2004).
 18. D. J. Min, M. L. Cho, S. H. Lee, S. Y. Min, W. U. Kim, J. K. Min, S. H. Park, C. S. Cho, H. Y. Kim, "Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts". *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, Vol.50, No.4, pp. 1146–1155, (2004).
 19. P. F. Zangerle, D. De. Groote, M. Lopez, R. J. Meuleman, Y. Vrindts, F. Fauchet, I. Dehart, M. Jadoul, D. Radoux, P. Franchimont, "Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood: II". Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cytokine*, Vol.4, No.6, pp. 568–575, (1992).
 20. H. Shen, J. C. Goodall, J. S. Hill Gaston, "Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis". *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, Vol.60, No.6, pp. 1647–1656, (2009).
 21. J. Leipe, M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops, A. Skapenko, "Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis". *Arthritis & Rheumatism*, Vol.62, No.10, pp. 2876–2885, (2010).
 22. Y. H. Kim, H. Park, "Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of medicinal plants used in the treatment of arthritis". *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, Vol.48, No.3, pp. 176–182, (2016).
 23. B. K. Lee, Y. C. Lee, J. C. Lee, "Inhibitory Effect of a Decoction of *Eucommia ulmoides* OLIVER and *Dipsacus asperoides* CY Cheng et TM Ai on Collagen II-induced Arthritis Mice". *The Korea Journal of Herbology*, Vol.25, No.1, pp. 55–63, (2010).
 24. W. P. Arend, J. M. Dayer, "Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis". *Arthritis and rheumatism*, Vol.38, No.2, pp. 151–160, (1995).
 25. H. J. Yeo, J. H. Lee, H. J. Lee, K. S. Byun, H. J. Im, M. J. Kim, "Microvascular Findings in Patients with Rheumatoid Arthritis-Assessed, Using Fundus Photography and Fluorescein Angiography". *Journal of Rheumatic Diseases*, Vol.20, No.4, pp. 231–237, (2013).
 26. J. K. Jung, K. H. Son, Y. S. Kim, Y. K. Park, "Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice". *The Korea Journal of Herbology*, Vol.26, No.3, pp. 1–6, (2011).
 27. B. Y. Sim, H. J. Choi, J. W. Bak, D. H. Kim, "Effects of GamiBangkeehwangkeetang (fángjǐhuángqí-tāng) ethanol extract on Collagen-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice". *The Korea Journal of Herbology*, Vol.29, No.6, pp. 95–102, (2014).