

원저

## 녹용약침이 백서의 제2형 Collagen 유발 관절염에서 iNOS 발현과 NO 생성 억제에 미치는 영향

이현진 · 조현석 · 황민섭 · 정찬영 · 이동건 · 김은정 · 김갑성 · 김경호

동국대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### Effect of *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture on Suppressing the Expression of iNOS and Production of NO in Type II Collagen-induced Arthritis Mice

Lee Hyun-jin, Cho Hyun-seok, Hwang Min-seob, Jung Chan-young, Lee Dong-gun,  
Kim Eun-jung, Kim Kap-sung and Kim Kyung-ho

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

**Objectives** : The objective of this study is to investigate the suppressing effect of the *cervi pantotrichum cornu* pharmacopuncture on the expression of iNOS mRNA and production of NO in synoviocytes from artificially arthritis-induced mice.

**Methods** : In vitro test, synoviocytes extracted from a knee joint of a mouse were cultivated, and the herbal extract of *cervi pantotrichum cornu*(0.4mg/ml, 0.6mg/ml, 0.8mg/ml, and 1.0mg/ml) was added into the wells of synoviocytes to suppress the expression of iNOS mRNA and production of NO. In vivo test, each ten mice were allocated into three groups; Normal group, CIA-elicited group(CIA), and group treated with *cervi pantotrichum cornu* pharmacopuncture after CIA elicitation(CCA). The extract of *cervi pantotrichum cornu* was injected into the acupoint of SP<sub>10</sub> to observe the changes of foot thickness in mice and the suppression of MIF, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, and iNOS.

**Results** : In vitro test, the expression of iNOS mRNA and production of NO were dose-dependently decreased in the wells of synoviocytes treated with PMA. In vivo test, the suppression of MIF, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, and iNOS was clearly shown in the pieces of the synovial joint treated with the extract of *cervi pantotrichum cornu*. The foot thickness also decreased dose-dependently.

· 접수 : 2008. 9. 10. · 수정 : 2008. 9. 18. · 채택 : 2008. 9. 30.  
· 교신저자 : 김경호, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지 동국대학교 부속분당한방병원 침구과  
Tel. 031-710-3727 E-mail : omdkkh@hanmail.net

**Conclusions** : It is speculated that the *cervi pantotrichum cornu* pharmacopuncture can be applicable to the therapy of rheumatoid arthritis by suppressing the expression of iNOS mRNA and production of NO.

**Key words** : *Cervi Pantotrichum Cornu*, MIF, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, iNOS, NO

## I. 서 론

류마티스성 관절염은 임상 양상이 아주 다양하게 나타나는 질환이므로 1987년 American College of Rheumatology에서 발표한 류마티스 관절염의 분류에 따르면 1시간 이상 지속되는 조조강직, 3개 이상의 관절 부위에 관절염, 손목과 중수수지 부위의 관절염, 대칭성 관절염, 류마티스양 소결절, 혈청 류마티스 인자 양성, 수지부 관절과 수근관절에 특징적인 방사선학적 변화의 7가지 진단 기준 중 4가지 이상 부합되는 경우 류마티스 관절염이라 정의하였다<sup>1)</sup>.

류마티스성 관절염은 발병 원인을 명확하게 알지 못하기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료 방법은 아직 없는 실정이다. 현재 쓰이고 있는 약물로 aspirin, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬제, 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug), 항TNF- $\alpha$ 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등의 약물이 광범위하게 사용<sup>2,3)</sup>되고 있다. 이런 약물들은 골수억제, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다<sup>1)</sup>.

이와 같으므로 한방에서는 근래에 류마티스성 관절염에 대한 鹿茸<sup>4)</sup>, 牛膝<sup>4)</sup>, 獨活<sup>5)</sup>, 蜂毒<sup>6)</sup>, 黃柏 및 威靈仙<sup>7)</sup> 등을 이용한 동물 실험 결과가 보고되었다. 그 중 녹용 약침에 대해서 최 등<sup>8)</sup>은 녹용 약침이 DHO-DHase(dihydro-orotate dehydrogenase)라는 효소의 활성을 저해하여 연골 세포의 RNA와 DNA 합성을 억제함으로써 세포 증식을 저해하는 효과에 관하여, 박 등<sup>9)</sup>은 녹용 약침이 류마티스성 관절염의 활액 내에서 나타나는 단백 분해 효소를 억제하는 효능에 관하여, 안 등<sup>10)</sup>은 체내에서 자가 항원 제시 효소로 작용하는 cathepsin S의 활성을 저해하는 녹용 약침의

효과에 대하여, 김 등<sup>11)</sup>은 관절염을 유발한 생쥐의 면역 세포와 그 활성 물질의 저해에 대한 녹용 약침의 효과에 대하여, 또한 정 등<sup>12)</sup>은 녹용 약침이 LPS 유발 관절염의 유허관절막내 과다 염증반응 조절에 미치는 영향에 대하여 각각 보고한 바 있다.

기존의 선행 연구가 주로 세포, 세포 내 효소와 면역 물질과 관련된 반면 본 연구에서는 관절염의 염증 과정중에 발현되는 iNOS와 그의 산물인 NO의 생성 억제에 대한 녹용 약침의 효과를 조사하기 위하여 in vitro 상에서 관절염이 진행되는 과정중에 발현되는 iNOS라는 효소와 발생 물질인 NO의 수치를 서로 비교하였으며, in vivo 상에서 각 군의 足蹠 浮腫, 유허관절막의 변화와 더불어 유허관절막 내의 cytokines, NF- $\kappa$ B, iNOS의 생성 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 동물

태령 6주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트, 한국)를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

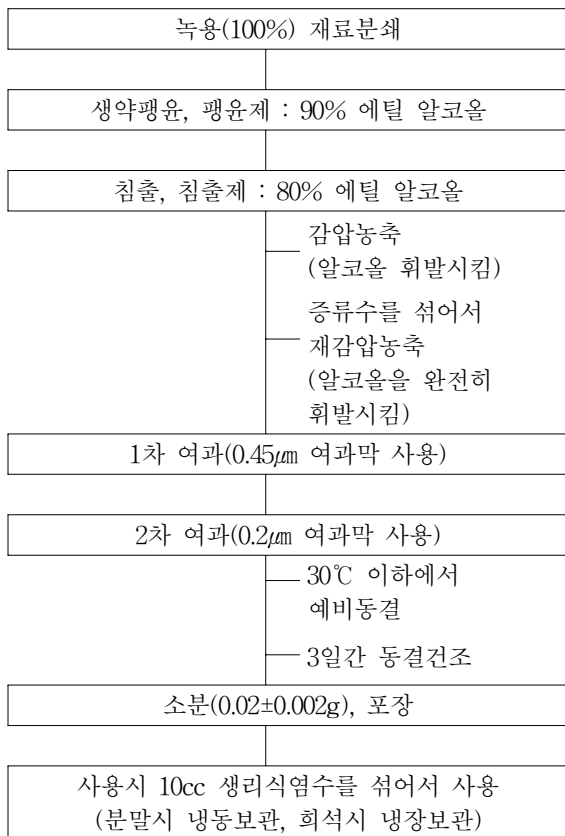
#### 2) 약침기

약침 주사기로 주로 분석용 소량 액체를 검사기에 주입하여 사용하는 10 $\mu$ l의 Hamilton syringe(Sigma, USA)를 사용하였다.

#### 3) 약침액의 조제

대한약침학회(서울, 대한민국)무균실에서 제조한 녹용 약침액을 사용하였다. 녹용 약침은 분쇄, 팽윤, 침

출, 여과 및 소분의 다섯 단계를 통하여 조제되었다. 분쇄 후 생약팽윤을 위해 팽윤제(90% 알코올)가 사용되었으며, 팽윤 후 침출제(80% 알코올)를 사용하여 침출하였다. 침출 과정은 두 단계로 나누어서 진행되었으며, 첫 번째 단계에서 알코올을 휘발하는 감압 농축법이 사용되었고, 두 번째 단계에서 증류수를 알코올과 섞어서 알코올을 완전히 휘발시키는 재감압농축법이 사용되었다. 여과법도 두 번에 걸쳐 진행되었으며, 1차 여과에서 0.45 $\mu$ m 여과막이 사용되었고 2차 여과에서 0.2 $\mu$ m 여과막이 사용되었다. 여과 과정 후 30 $^{\circ}$ C 이하에서 예비동결한 후 3일간 동결 건조하였다. 동결 건조 후 소분하여 포장하였으며, 10cc 생리식염수를 섞어서 사용하였다. 약침액은 분말 상태에서 냉동 보관하였고, 희석된 상태에서 냉장 보관하였다.



Scheme 1. Processing of the *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture Solution

## 2. 방법

### 1) 실험군의 분류

정상군(어떤 처치도 하지 않은 군 : Normal Group),

대조군(류마티스 관절염 유발군 : CIA군), 실험군(류마티스 관절염 유발 후 녹용 약침 시술군 : CCA군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

### 2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 생쥐 무릎의 윤활관절세포는 관절염이 유발된 암컷 생쥐 무릎관절에서 적출하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 윤활관절주머니를 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, USA)에 2시간 동안 반응하여 윤활관절막을 분리하고 세절하였다. 0.1% collagenase에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리한 다음 3,000rpm에 5분간 원심분리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Sigma, USA)가 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3-5회 계대배양 세포를 사용하였다.

### 3) 윤활관절세포내 iNOS mRNA 유전자 발현 및 NO 생성 변화 조사

(1) iNOS mRNA 발현 측정을 위한 RT-PCR  
 염증효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA 발현 양상을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-poly-merase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 윤활관절세포의 5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, 1ng/ml)를 1시간 처리하여 iNOS mRNA 발현을 유도한 후 녹용 약침액 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0mg/ml를 각각 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출하고 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS primer (sense, 5'-AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC-3'; antisense, 5'-AGA ACT GAG GGT ACA TGCT GGA GCC-3')를 PCR machine으로 반응시켰다. PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인  $\beta$ -actin (sense,

5'-GGA GAA GAT CTG GCA CCA CACC-3'; antisense, 5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG-3')의 증폭을 동시에 실시하였다.

## (2) Nitrite Assay

Nitrite assay를 통해 NO 생성량을 측정하였는데, 12시간 배양된 윤활관절세포의  $5 \times 10^5$  cells/well에 PMA ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1시간 처리 후 녹용 추출물을 농도별(0.4, 0.6, 0.8 및  $1.0 \text{mg}/\text{ml}$ )로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액 상층액  $50 \mu\text{l}$ 에 Greiss reagent(Sigma, USA)  $50 \mu\text{l}$ 을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨( $\text{NaNO}_2$ )을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, 질소산화물(nitric oxide,  $\text{NO}_2^-$ ) 생성을 산출하였다.

## 4) CIA 생쥐에서 iNOS 생성 조절에 의한 조직 손상 완화 관찰

### (1) 항원제조와 콜라겐 유발 관절염 (collagen-induced arthritis; CIA)

CIA를 유발을 위해 우선 native bovine type II collagen(CII, Chondrex, USA)을 10mM acetic acid에  $4 \text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 녹인 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하였다. CII와  $4 \text{mg}/\text{ml}$ 의 complete Freund's Adjuvant containing mycobacterium tuberculosis strain H37RA (CFA, Chondrex)를 동량으로 섞은 후 균질기를 이용하여 1,000rpm의 속도로 혼합하였다. CIA의 유발을 위한 1차 접종을 CII와 CFA 혼합액  $50 \mu\text{l}$ 를 꼬리연결 근육부위에 피내주사를 통해 실시하였으며, 1차 접종 2주 후에 CII와 CFA 혼합액  $25 \mu\text{l}$ 를 발바닥에 추가 접종하여 CIA를 유발하였다. CIA 유발 후 1주일 간격으로 발의 두께 변화를 dial thickness cage (Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

### (2) 녹용 약침의 시술

CIA 유발 제3일부터 제28일까지 녹용 약침  $50 \mu\text{l}/\text{kg}$ 을 인체의 血海( $\text{SP}_{10}$ )에 상응하는 생쥐의 일측의 슬관절 부위에 1일 1회 시술하였다.

### (3) 윤활관절 표본 제작

CIA 유발 후 제28일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% neutral buffered formalin(NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification

solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여  $5 \mu\text{m}$  두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

## (4) 윤활관절막내 iNOS 생성 억제 기전 조사를 위한 면역조직화학

### ① CIA 유발 관련 cytokine의 변화 조사

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF과 pro-inflammatory cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 의 윤활관절막내 분포변화를 조사하기 위해 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti mouse MIF (1:200, Santa Cruz Biotech, USA)과 rabbit anti mouse TNF- $\alpha$ (1:200, Santa Cruz Biotech, USA)에  $4^\circ\text{C}$  humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-rabbit IgG(DAKO, Denmark)에  $4^\circ\text{C}$  humidified chamber에서 24시간 link하였다. Avidin biotin complex(DAKO, Denmark)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### ② NF- $\kappa\text{B}$ 활성 변화 관찰

iNOS의 전사인자 nuclear factor(NF)- $\kappa\text{B}$  활성 변화를 조사하기 위해 nuclear factor(NF)- $\kappa\text{B}$  p65 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

### ③ iNOS 생성 변화 관찰

iNOS의 조직내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1:500, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

## 5) 영상분석과 통계처리

iNOS 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigmaplot 2000을 통해 유의성을 검증하였다.

### III. 결 과

#### 1. 율관절세포내 iNOS mRNA 유전자 발현 및 NO 생성 억제

##### 1) 율관절세포내 iNOS 유전자 발현 억제

PMA 자극에 의한 율관절세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 녹용약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었으나, 유의성은 없었다. 즉 PMA 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 녹용약침액은 0.4mg/ml에서 18%, 0.6mg/ml에서 25%, 0.8mg/ml에서 26%, 1.0mg/ml에서 31%가 감소하였다(Fig. 1-A).

##### 2) NO 생성 억제

PMA 처리된 율관절세포에서 NO 생성은 정상 율관절세포에 비해 421%(4.17±0.09μm/5×10<sup>5</sup>cells)로 증가한 반면, 녹용 약침액으로 처리된 율관절세포의 NO 생성량은 PMA 처리 후 발생한 NO 생성량에

비해 0.4mg/ml 처리 시 27%(3.06±0.02μm/5×10<sup>5</sup>cells), 0.6mg/ml 처리 시 43%(2.36±0.03μm/5×10<sup>5</sup>cells), 0.8mg/ml 처리 시 62%(1.57±0.13μm/5×10<sup>5</sup>cells) 그리고 1.0mg/ml 처리 시 66%(1.44±0.04μm/5×10<sup>5</sup>cells)가 감소하여 모두 유의성(P<0.05)이 있는 농도 의존적 감소를 보였다(Fig. 1-B).

#### 2. CIA 생쥐에서 iNOS 생성 조절에 의한 조직 손상 완화

##### 1) 足蹠 浮腫 변화

정상군에 비해 CIA군에서는 부중에 의한 足蹠 浮腫이 크게 증가하였는데, 원래 두께에 비해 CIA 유발 제7일 경과 후 4.46±0.15mm로써 가장 큰 증가를 보였으며, 이후 시간이 경과할수록 足蹠 浮腫은 감소하는 경향을 보였다. 녹용 약침을 시술한 CCA군은 CIA군에 비하여 7일(3.98±0.14mm), 14일(3.60±0.11mm), 21일(3.13±0.18mm) 및 28일(2.52±0.11mm) 모두 유의성(P<0.05)이 있는 足蹠 浮腫의 감소가 있었으며, 시간이 경과할수록 足蹠 浮腫의 감소가 증가하였다(Table 1, Fig. 2-A).

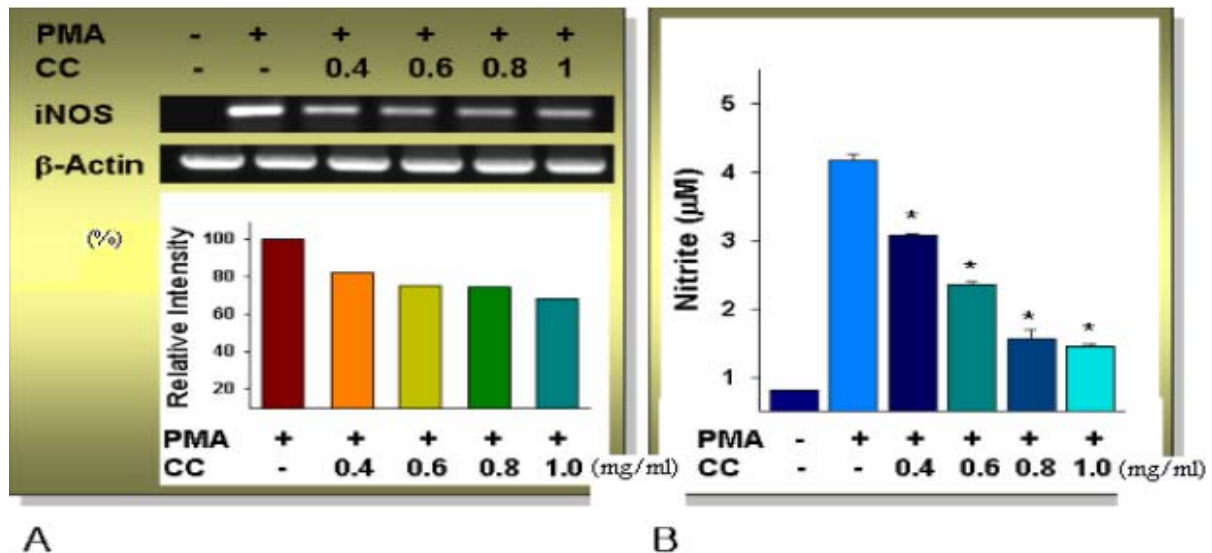


Fig. 1. Inhibition of PMA-induced iNOS mRNA expression (A) and NO production (B) by *Cervi Pantotrichum Cornu* Herbal Extract(CC)

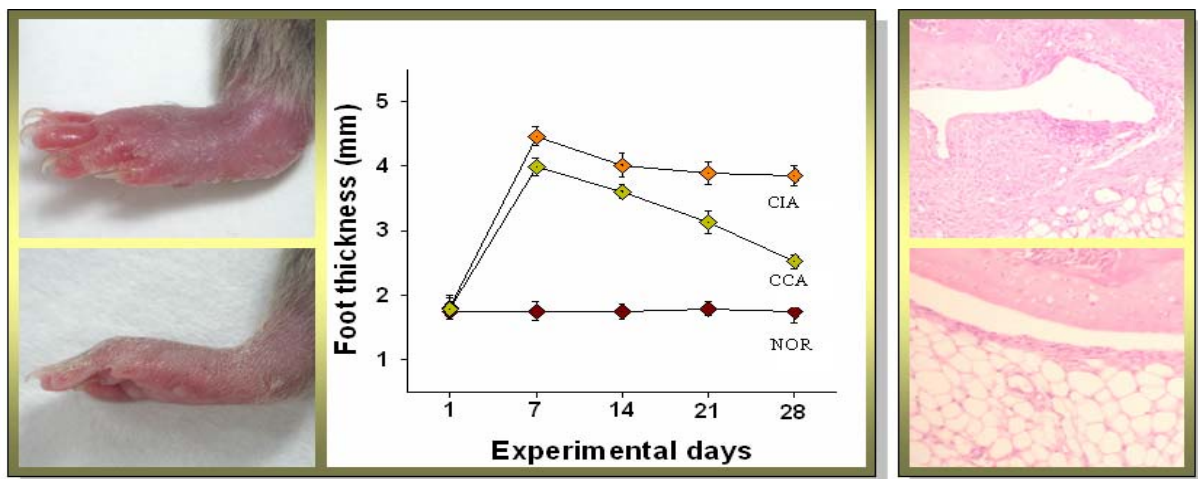
The synoviocytes cells were treated with PMA for 1 hour prior to the addition of indicated concentrations(0.4, 0.6, 0.8 and 1.0mg/ml) of CC, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced iNOS mRNA expression and NO production were dose-dependantly decreased in CC-treated synoviocytes.

Abbreviation. PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; CC, *cervi pantotrichum cornu* herbal extract; iNOS, inducible nitric oxide synthase; \*, P<0.05 compared with PMA alone.

Table 1. Inhibition of Foot Thickness in CIA(Collagen-induced Arthritis)-evoked Mice by *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture (mm)

Objective	Group		
	NOR	CIA	CCA
1st day	1.74±0.12	1.81±0.18	1.79±0.17
7th day	1.75±0.15	4.46±0.15	3.98±0.14*
14th day	1.74±0.12	4.01±0.19	3.60±0.11*
21th day	1.79±0.11	3.89±0.18	3.13±0.18*
28th day	1.75±0.17	3.85±0.15	2.52±0.11*

Abbreviation. M±S.D, Mean±Standard Deviation; NOR, Normal group; CIA, collagen-induced arthritis group; CCA, group treated with *cervi pantotrichum cornu* pharmacopuncture after CIA; \*, P<0.05 compared with CIA.



A

B

Fig. 2. Mitigation of CIA in Foot and Knee Joint by *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture

A. Inhibition of foot thickness (upper photo, CIA; lower photo, CCA, x4).

B. Diminution of synovial membrane damaged by CIA (upper photo, CIA; lower photo, CCA, H&E, x40).

Abbreviation. NOR(◆), Normal group; CIA(◆), collagen-induced arthritis group; CCA(◆), group treated with cervi pantotrichum cornu pharmacopuncture after CIA;

## 2) 일반적인 형태 변화

CIA 유발 후 윤활관절막의 자유면에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가였다. 윤활강 쪽으로 많은 돌기를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 자유면으로 침윤하는 림프구의 증가와 모세혈관 출현 증가도 관찰되었다. 그러나 CCA군은 CIA군에서 나타난 형태 변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 CIA군에 비해 윤활관절막의 자유면 두께 증가가 적었고, 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소하여 매끄러운 표면상태로 나타났다. 또한

윤활관절막 자유면으로의 림프구 침윤 증가와 모세혈관 출현도 감소하였다(Fig. 2-B).

## 3) 윤활관절막내 iNOS 생성 억제

### (1) CIA 유발 관련 cytokine 억제

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 MIF 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군(218±6particles)에 비해 1117%(2652±151particles) 증가하였으나, CCA군은 CIA군에 비해



74%(697±61particles)로 유의성(P<0.05) 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 3-A).

한편 전염증효소인 TNF-α의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 TNF-α 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF-α 양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군(233±10particles)에 비해 933%(2406±105particles) 증가하였지만, CCA군은 CIA군에 비해 70%(732±53particles)로 유의성(P<0.05) 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 3-B).

(2) NF-κB 활성 억제

iNOS 생성에 관여하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군(370±4particles)에 비해 832%(3449±232particles) 증가하였지만, CCA군은 CIA군에 비해 59%(1405±114 particles)로 유의성(P<0.05) 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 3-C).

Table 2. The Image Analysis for Inhibition of iNOS by *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture.

Objective	Group		
	NOR	CIA	CCA
MIF	218±6	2652±151	697±61*
TNF-α	233±10	2406±105	732±53*
NF-κB p65	370±4	3449±232	1405±114*
iNOS	208±10	2753±173	818±21*

Abbreviation. MIF, macrophage migration inhibitory factor; TNF-α, tumor necrosis factor-α; NF-κB p65, nuclear factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase. NOR, Normal group; CIA, collagen-induced arthritis group; CCA, group treated with cervi pantotrichum cornu pharmacopuncture after CIA; \*, P<0.05 compared with CIA.

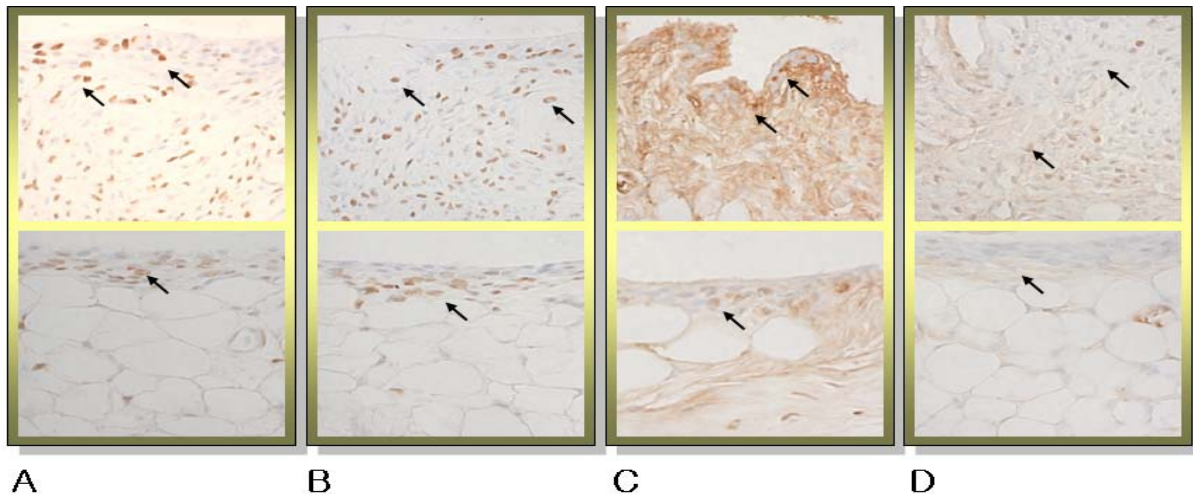


Fig. 3. Suppression of iNOS Activation by *Cervi Pantotrichum Cornu* Pharmacopuncture (CIA, Uppert-box; CCA, Lower-box)

- A. Decrease of MIF (MIF (arrow) immunohistochemistry, x400).
- B. Decrease of TNF-α (TNF-α (arrow) immunohistochemistry, x400).
- C. Suppression of NF-κB p65 (NF-κB p65 (arrow) immuno-histochemistry, x400).
- D. Inhibition of iNOS (iNOS (arrow) immunohistochemistry x400).

Abbreviation. MIF, macrophage migration inhibitory factor; TNF-α, tumor necrosis factor-α; NF-κB p65, nuclear factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase; CIA, collagen-induced arthritis group; CCA, group treated with cervi pantotrichum cornu pharmacopuncture after CIA.

(3) iNOS 생성 억제

iNOS의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군(208±10particles)에 비해 1224%(2753±173particles) 증가하였지만, CCA군은 CIA군에 비해 70%(818±21particles)로 유의성(P<0.05) 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 3-D).

IV. 고찰

류마티스성 관절염은 전신적인 만성 염증성 질환으로 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증이 야기되어, pannus에 의한 뼈의 파괴, 윤활관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백분해효소, O<sub>2</sub> radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 일어난다<sup>13)</sup>. 이러한 류마티스성 관절염이 심한 경우 류마티스성 결절(rheumatoid nodules), 맥관염(rheumatoid vasculitis), 안염증(eye inflammation), 신경기능 이상(neurologic dysfunction), 심폐기능 장애, 림프절 병증(lymphadenopathy), 비장 거대증(splenomegaly) 등의 관절 외 류마티스 증상이 발현된다<sup>14)</sup>. 한편 류마티스성 관절염은 주로 30-40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병률을 보이고 있지만 보통 평균 유병율은 0.8%로 추정되며, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다<sup>1)</sup>.

류마티스성 관절염의 발병 원인은 불확실한데 비하여, 류마티스성 관절염 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다. 요약해 보면, 윤활액내의 type II collagen 역가 증가<sup>15)</sup>, macrophage migration inhibitory factor(MIF)의 증가<sup>16)</sup>, pro-inflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF 및 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 증가<sup>17,18)</sup>, 염증성 전사인자인 nuclear factor-κB의 활성화와 염증효소 cyclooxygenase(COX)-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가<sup>19,20)</sup>, 단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)의 증가<sup>21,22)</sup> 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과면역반응에 의해 발생하게 된 것이며

심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류마티스성 관절염은 발병 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 그래서 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성 소염제(salicylate), 단순 소염제, 부신피질호르몬(corticosteroid), 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug), 항TNF-α제제(infliximab, etanercept, adalimumab), 면역억제제(cyclosporin A, cyclophosphamide, chloroquine, methaotrexate), 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다<sup>2,3)</sup>. 각각은 골수억제, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다<sup>1)</sup>.

한의학에서 류마티스 관절염은 痺證의 범주에 속한다고 볼 수 있다. 《黃帝內經·素問·痺論》<sup>23)</sup>에서 風寒濕에 의하여 발생하며, 行痺, 痛痺, 着痺 등에 대해 언급하고 있으며, 漢代 張仲景은 《傷寒論》<sup>24)</sup>의 <太陽病脈證并治篇>과 《金匱要略》<sup>25)</sup> <瘧濕喝病脈證并治篇>, <中風歷節病脈證并治篇>에서 濕痺, 歷節病을 언급하고 있다. 隋代 醫家인 巢元方은 《諸病源候論》<sup>26)</sup>에서 痺證을 風濕痺, 風痺, 麻不仁, 風冷, 風四肢拘攣不得屈伸 등의 증후로 나누어 파악하였다.

한국에서 전통적으로 쓰여 온 약재 중 하나인 鹿茸은 《東醫寶鑑》<sup>27)</sup>·湯液編·獸部>에 “性溫味甘酸無毒, 療虛勞羸瘦, 四肢腰脊痠疼, 補男子腎虛冷, 脚膝無力, 夜夢鬼交泄精, 女人崩中漏血, 及赤白帶下, 能安胎”라 하였으며, 현대에서도 항노화 작용과 더불어 면역계에 작용하는 효과가 있다고 알려져 있다<sup>1)</sup>.

RA 유발시 윤활관절막의 두께 비후는 자유면에 위치한 윤활분비세포 또는 섬유모세포유사윤활세포(fibroblast like synoviocyte ; FLS)의 세포과형성으로 기인된 것으로 MIF 활성화에 의한 세포분열의 촉진과 세포자기살해의 억제의 결과이다. MIF는 in vitro 와 in vivo 실험을 통해 류마티스성 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다<sup>28)</sup>. FLS의 증가는 IL-1β, IL-2, cell adhesion molecule(CAM)의 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생 증가와 섬유화(fibrosis)와 염증부위의 이주세포 증가를 유도한다<sup>29)</sup>. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1β 신호기전에 의한 것으로 collagen fiber의 합성 촉진과 collagenase의 합성



을 또한 유도하고<sup>30)</sup>, 관절염 유발시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용<sup>31)</sup>, 관절내 연골과 연골하 골조직의 파괴<sup>32)</sup> 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다<sup>33)</sup>.

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비 증가를 일으키며, 그 결과 염증관련 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도한다. 1986년 B cell에서 immunoglobulin  $\kappa$  light chain에 결합하는 인자로서 발견된 전사인자 NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B)는 p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성되며, 보통 상태에서는 세포질에서 그 inhibitor인 I $\kappa$ B protein(I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl3)들과 결합하고 있어 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokines(TNF- $\alpha$ , IL-1), bacterial/viral infection(LPS, dsRNA), stress(ROI, UV, adriamycin, 방사선) 등의 다양한 자극에 의해 I $\kappa$ B protein이 인산화되어 분해됨으로써 유리된 NF- $\kappa$ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site(consensus sequence: 5'-GGGpN $\kappa$ NPpPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다<sup>34)</sup>. I $\kappa$ B protein의 인산화는 I $\kappa$ B kinase로 알려진 IKK(IKK  $\alpha$ ,  $\beta$ )에 의해서 일어나게 되는데 IKK의 활성화는 다양한 자극에 의해 유도되어 I $\kappa$ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로써 인산화된 I $\kappa$ B protein은 ubiquitination되어 26S proteasome에 의해서 분해된다(degradation). 전사인자 NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 pro-inflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 염증효소 iNOS COX-2 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다<sup>35-37)</sup>. iNOS는 ROS의 일종인 산화질소를 생성하는데, 산화질소(NO)는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하고 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고<sup>38)</sup>, 이는 세포막지질을 peroxidation시키며, SH기(thiol)를 oxidation하여 세포독성을 유발한다<sup>39)</sup>. 또한 단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포대사에 중요한 cytochrome p450을

억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다<sup>40)</sup>.

본 연구에서 녹용이 류마티스 관절염의 염증 과정 중에 나타나는 iNOS 발현과 NO 생성을 효과적으로 억제하는지 알아보기 위하여 진행되었다. 본 연구의 in vitro 상에서 류마티스 관절염 염증 과정 중에 나타나는 iNOS 발현과 그 부산물인 NO의 양이 녹용 약침을 투여하여 보다 감소하는지 보았다. 이를 위해 녹용 추출물로 처리된 윤활관절세포에서 iNOS mRNA 발현과 NO 생성량을 측정하였다. 본 연구의 in vivo 상에서 CIA 유발 DBA 생쥐의 인체 血海(SP<sub>10</sub>)에 상응하는 일측의 슬관절 부위에 녹용 약침 시술 후 변화를 관찰하였다. 녹용 약침 시술 후 변화를 비교하기 위하여 足蹠浮腫, 윤활관절막의 일반적인 형태, 초기 CIA 유발 cytokine(MIF와 TNF- $\alpha$ ) 그리고 NF- $\kappa$ B 활성화와 염증효소 iNOS 생성 변화를 관찰하였다.

PMA로 자극받은 윤활관절세포는 iNOS mRNA 발현과 NO 생성이 증가하였으나, 녹용 추출물로 처리 후 iNOS mRNA 발현과 NO 생성이 농도-의존적으로 감소하였다. PMA 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 녹용 추출물 0.4mg/ml에서 18%, 0.6mg/ml에서 25%, 0.8mg/ml에서 26%, 1.0mg/ml에서 31%가 감소하였다. PMA 처리된 윤활관절세포에서 NO 생성은 421%(4.17 $\pm$ 0.09 $\mu$ m/5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells)로 증가한 반면, 녹용 추출물로 처리된 윤활관절세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 녹용 추출물 0.4mg/ml 처리 시 27%(3.06 $\pm$ 0.02 $\mu$ m/5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells), 0.6mg/ml 처리 시 43%(2.36 $\pm$ 0.03 $\mu$ m/5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells), 0.8mg/ml 처리 시 62%(1.57 $\pm$ 0.13 $\mu$ m/5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells) 그리고 1.0mg/ml 처리 시 66%(1.44 $\pm$ 0.04 $\mu$ m/5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells)로 감소하였다.

足蹠浮腫의 변화를 정상군, CIA군 및 CCA군으로 나누어 비교해 보았다. 정상군에 비해 CIA군에서는 부종에 의한 足蹠浮腫이 크게 증가하였는데, 원래 두께에서 비해 CIA 유발 7일 경과 후 가장 큰 증가를 보였다. 이후 시간이 경과할수록 足蹠浮腫은 감소하는 경향을 보였다. 녹용 약침을 시술한 CCA군에서도 足蹠浮腫이 증가하였지만 CIA군보다는 크게 증가하지 않았다.

CIA 유발 후 윤활관절막의 자유면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가였다. 윤활강 쪽으로 많은 돌기(filopodia)를 내어

마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 자유면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 자유면 쪽으로 침윤하는 림프구의 증가와 모세혈관 출현 증가도 관찰되었다. 그러나 CCA군은 CIA군에서 나타난 형태변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 CIA군에 비해 윤활관절막의 자유면 두께의 증가가 적었고, 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소하여 매끄러운 표면 상태로 나타났다. 또한 윤활관절막 자유면으로의 림프구 침윤 증가와 모세혈관 출현도 감소하였다.

이와 더불어 관절염의 염증 과정 중에 iNOS 발현과 NO 생성을 유발하는 물질인 TNF- $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B도 CIA군과 CCA군을 비교하여 보았다. 전염증 인자인 TNF- $\alpha$ 의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 TNF- $\alpha$  양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF- $\alpha$  양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군에 비해 933%(2406 $\pm$ 105particles) 증가하였지만, CCA군은 CIA군에 비해 70%(732 $\pm$ 53particles) 감소하였다. iNOS 생성에 관여하는 전사인자 NF- $\kappa$ B p65의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서는 증가하는 반면 CCA군에서는 감소하였다. 이런 NF- $\kappa$ B p65 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF- $\kappa$ B p65 양성반응의 영상분석 결과 CIA군은 정상군에 비해 832%(370 $\pm$ 4particles) 증가하였지만, CCA군은 CIA군에 비해 59%(1405 $\pm$ 114particles) 감소하였다.

이상의 결과로 녹용은 iNOS 발현과 NO 생성 억제뿐만 아니라 초기 CIA 유발 cytokine인 MIF와 TNF- $\alpha$  및 NF- $\kappa$ B의 억제에 기여함으로써 과도한 염증작용을 조절하여 류마티스성 관절염으로 기인된 관절 손상을 완화시키는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

녹용의 iNOS 발현과 NO 생성 억제가 류마티스성 관절염 치료에 미치는 영향을 조사하기 위해 녹용 추출물로 처리된 윤활관절세포에서 iNOS mRNA 발현과 NO 생성량을 측정하였고, CIA 유발 DBA 생쥐의 인체 血液(SP<sub>10</sub>)에 상응하는 일측의 슬관절 부위에 녹

용 약침 시술 후 足蹠 浮腫, 윤활관절막의 일반적인 형태, 초기 CIA 유발 cytokines(MIF와 TNF- $\alpha$ ) 및 NF- $\kappa$ B 활성과 염증효소 iNOS 생성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PMA로 자극된 윤활관절세포에서의 iNOS mRNA 발현의 증가가 녹용추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다.
2. PMA로 자극된 윤활관절세포에서 NO 생성은 증가한 반면, 녹용 추출물로 처리된 윤활관절세포에서는 농도-의존적 감소를 보였다.
3. 足蹠 浮腫 유발 시술에서 CCA군의 足蹠 浮腫이 CIA군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(P<0.05).
4. CIA 유발 후 윤활관절막 자유면의 두께 증가, 윤활세포들의 출현, 윤활관절막의 림프구 침윤 증가 및 모세혈관 출현이 CIA군에 비해 CCA군에서 감소하였다.
5. MIF의 양성반응세포의 분포, TNF- $\alpha$ 의 양성반응세포의 분포, NF- $\kappa$ B p65의 양성반응세포의 분포 및 iNOS의 양성반응세포의 분포는 CIA군에서 증가한 반면 CCA군에서 유의성 있게 감소하였다(P<0.05).

## VI. 참고문헌

1. 헤리슨내과학편찬위원회. 헤리슨 내과학. 16판. 서울 : 도서출판 MIP. 2006 ; 2148-57.
2. Matthew H Ornstein and Kirk Sperber. The antiinflammatory and antiviral effects of hydroxychloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996 ; 39(1) : 157-61.
3. 송정수. 류마티스관절염의 완치를 향하여. *대한내과학회지.* 2005 ; 69(6) : 581-9.
4. 이승덕, 김갑성. 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발관절염의 세포성 면역반응에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1999 ; 16(3) : 287-318.
5. 양기영, 김영일, 이현. 족삼리 독활약침이 collagen-induced arthritis에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2006 ; 23(3) : 191-206.
6. 정인태, 백용현, 박동석, 최도영. 봉독약침이 collagen

- 유발 관절염에 미치는 진통효과 및 그 기전연구. 대한0침0침구학회지. 2005 ; 22(1) : 99-108.
7. 장준혁, 김갑성, 김철호. 황백 및 위령선약침이 lipopolysaccharide 유발 관절염의 IL-1베타 발현 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(1) : 511-31.
  8. 최유행, 최우식, 송인광, 박준성, 이승덕, 김갑성. 녹용약침액이 생쥐의 type II collagen 유발 관절염과 인산이온 유발 연골세포의 세포사에 있어 보호작용에 관한 연구. 대한침구학회지. 2002 ; 19(4) : 10-27.
  9. 박상동, 김민정, 이아람, 장준혁, 김경호. 류마티스 관절염 실험용쥐의 활액에서 단백분해효소의 활성 및 항산화에 대한 녹용약침의 효과. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 51-64.
  10. 안형준, 김갑성. 생쥐에서 녹용약침액이 자가항원 제시형 cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염 억제에 미치는 효과. 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 104-16.
  11. 김진규, 김갑성. Type II Collagen으로 유발된 관절염에 대한 녹용약침의 억제효과에 관한 연구. 대한침구학회지. 2002 ; 19(6) : 155-70.
  12. 정용래, 이승덕, 변혁, 박인식, 정찬영, 이창환, 김갑성. 녹용약침이 LPS 유발 관절염의 유행관절막내 과다염증반응 조절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007 ; 24(4) : 167-81.
  13. Peter Schenck, Stefan Schneider, Rolf Miehle and Peter Prehm. Synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1995 ; 22 : 400-5.
  14. Stephen LD, Koda-Kimble MA eds. Rheumatic disorders, Applied Therapeutics: the clinical use of drugs. 6th, ed. Vancouver, WA : Appl Therap Inc. 1995 ; 1-27.
  15. Leo AB Joosten, Monique MA Helsen, Fons AJ van de Loo, Wim B van de Berg. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in dba/a mice. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
  16. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. J Internal medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
  17. Leech M, Metz CN, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis: evidence for pro-inflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum. 1999 ; 42 : 1601-8.
  18. Marc Feldmann, Fionula M Brennan, and Ravinder N Maini. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-440.
  19. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1273-80.
  20. Yasmina J, Catalina A, Carmen M, Alicia A, Irene G, Florencia R, Rosa P, Javier L. Protective effect of vasoactive intestinal peptid bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res & Therapy. 2005 ; 7 : R1034-45.
  21. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases; role in arthritis. Front Biosci. 2006 ; 11 : 529-43.
  22. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. J Biol Chem. 2000 ; 275 : 444-50.
  23. 李慶雨 譯 黃帝內經素問. 서울 : 여강출판사. 1997 : 73-96.
  24. 蔡仁植. 傷寒論譯註. 서울 : 고문사. 1984 : 9-141.
  25. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北 : 大聯國風出版社. 1950 : 30-9.
  26. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1968 : 110, 226, 400.
  27. 허준 저. 동의보감국역위원회 역. 동의보감. 서울 : 법인문화사. 1999 : 1839.
  28. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. J Internal Medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
  29. Carlene Tsai, Luis A, Diaz JR, Nora G Singer, Lan Lan Li, Anita H Kirsch, Raj Mitra, Brian J Nickoloff, Leslie J Crofford and David A Fox. Responsiveness of Human T Lymphocytes to

- Bacterial superantigens presented by cultured Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *Am College Rheumto.* 1996 ; 39(1) : 125-36.
30. Mizel SB, Dayer JM, Krane SM and Mergenhagen SE. Stimulation of Rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor(IL-1). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 ; 78 : 2474-86.
31. Pettipher ER, Higgs GA and Henderson B. IL-1 induces leukocytes infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 ; 83 : 8749-56.
32. Saklatvala J. IL-1-Purification and biochemical aspects of its action on cartilage. *J Rheum.* 1987 ; 14 : 52-8.
33. Bunning R, Crawford A, Richardson H, Open-dakker G, van Damme J and Russell R. IL-1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Acta.* 1987 ; 924 : 437-49.
34. Baeuerle PA and Baltimore D. NF- $\kappa$ B-Ten years after. *Cell.* 1996 ; 87 : 13-20.
35. Baeuerle PA. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998 ; 95 : 729-31.
36. Z Morise, S Komatsu, JW Fuseler, DN Granger, M Perry, AC Issekutz and MB Grisham. ICAM-1and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. *Am J Physio.* 1998 ; 27 : G246-52.
37. YX Li, N Li, YS Li, B Wu and JS Li. Up-regulated intragraft gene expression, ICAM- 1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. *Transplant Proceed.* 2000 ; 32 : 1283-86.
38. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994 ; 9 : 1199-206.
39. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of super-oxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991 ; 1 ; 288(2) : 481-7.
40. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 20 : 91(26) : 12383-7.