

관절9호방이 생쥐의 Collagen II 유발 관절염에 미치는 영향

김은혜 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Inhibitory Effects of Gwanjul9-bang on Collagen Induced Arthritis in DBA/1J Mouse

Eun Hye Kim, Min Seok Oh*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

This study was carried out to know the effects of Gwanjul9-bang (hereinafter referred to GJ9) on the inhibition of arthritis induced by collagen on DBA/1J mouse. For this purpose, GJ9 was orally administered to mouse with arthritis induced by collagen II. Cytotoxicity, hepatotoxicity, arthritis index, value of immunocyte in draining lymph node and paw joint, rheumatoid factor (IgG, IgM) in serum were measured in vivo. The cytotoxicity against hFCs was not measured in any concentration. The hepatotoxicity was low in GJ9 treated group compared with MTX group. The arthritis index was decreased significantly. In total cell counts of DLN and paw joint, the cells in DLN increased significantly while there was significantly decrease in paw joint. In lymph nodes, CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD3⁺CD69⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD49b⁺, CD4⁺CD44⁺, CD3⁺CD8⁺ cells increased significantly, B220⁺CD23⁺ cells decreased significantly. In joints, CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD11b⁺Gr-1⁺ cells decreased significantly. The levels of IgG and IgM was significantly decreased compared with control. Anti-collagen II in serum was significantly decreased compared with control. The degree of arthritis induced damage of joint of GJ9 group is slight compared with control group in histopathologic observation (Hematoxylin & Eosin, Masson's Trichrome). Comparison of the results for this study showed that GJ9 had immunomodulatory effects. So we expect that GJ9 should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease. Therefore we have to survey continuously in looking for the effective substance and mechanism in the future.

Key words : Gwanjul9-bang(GJ9), rheumatoid arthritis, DBA/1J mouse, collagen induced arthritis, immunocyte

서 론

류마티오이드 관절염은 여러 기관을 침범하는 가장 흔한 만성적인 염증성 질환의 하나로, 활액막의 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위 조직을 파괴하고 관절 강직 및 변형이 유발된다^{1,2)}.

류마티오이드 관절염은 한의학적으로痺症의 범주에 속하며, 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風 등으로 표현할 수 있다³⁾. 따라서 한의학계에서는 주로 痺症, 歷節風 등에 활용되는 한약 및 처방을 이용하여 류마티오이드 관절염 억제 및 치료 연구를 실시하고 있다. 연구 방식은 자가 면역과 관련된 연구를 위해 널리 사용되고 있

는 type II collagen 유발 관절염 동물 모델을 통한 실험적 연구이며, 이 방식은 1977년 Trenham 등⁴⁾에 의해서 흰쥐에서 type II collagen 점증으로 인한 관절염 모델이 확립된 이후 임상적, 조직학적 및 면역학적으로 사람의 류마티오이드 관절염 모델로서 널리 이용되고 있는 방법이다.

Collagen II을 이용한 실험적 연구가 행해진 처방으로는 疎風活血湯加味⁵⁾, 桂枝芍藥知母湯⁶⁾, 大羌活湯⁷⁾, 三痺湯⁸⁾ 등이 있는데, 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 조건을 비교하는데서 탈피하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다⁹⁾.

관절9호방은 류마티오이드 관절염에 활용하기 위해 만들어진 저자의 창안방으로 鷄血藤, 稀簽, 玄胡索, 蒼朮, 黃柏, 羌活, 升麻, 藁朮, 柴胡, 澤瀉, 白朮, 紅花로 구성되어 있다. 이 중 鷄血藤^{10,11)}은 行血補血, 舒筋活絡 하며 류마티오이드 관절염 환자의 활막세포

* 교신저자 : 오민석, 대전시 서구 둔산동 둔산한방병원 한방재활의학과교실
· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 042-470-9424
· 접수 : 2010/05/07 · 수정 : 2010/06/04 · 채택 : 2010/06/08

와 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염을 억제하는 효과가 있으며, 豨薺¹²⁾은 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒 하며 항류마티즘과 염증성 cytokine을 억제하는 효과가 있고, 玄胡索¹³⁾은 活血散瘀, 止痛 하여 胸脇脘腹疼痛 및 跌撲腫痛을 치료하며, 蒼朮¹⁴⁾은 燥濕健脾, 祛風濕 하여 항균 및 항바이러스의 효과가 있고, 黃柏¹⁴⁾은 清熱燥濕, 瀉火解毒 하여 항균 및 항궤양의 작용이 있는 것으로 알려져 있다.

이에 저자는 관절9호방이 류마티스 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, collagen II로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능에 미치는 영향, arthritis index, draining lymph node와 paw joint 내 총세포수에 미치는 영향과 면역세포에 대한 형광 유세포 분석, 혈청 내 rheumatoid factor 분석, 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정 및 조직학적 변화 등을 관찰한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 폴라스인터내셔널 (서울, 한국)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J 흰 쥐 32마리를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0 ± 2°C, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 식이는 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.

2) 약제

본 실험에 사용한 관절9호방 (이하 GJ9로 표기함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정성하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of Gwanjul9-bang (GJ9)

Herb Name	Pharmacognostic nomenclature	Amount (g)
蒼朮	<i>Attractylodes Rhizoma</i>	18.75
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	18.75
羌活	<i>Angelicae koreanae Radix</i>	1.87
鷄血藤	<i>Mucunae Caulis</i>	12.00
豨薺	<i>Siegesbeckiae Herba</i>	8.00
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	6.00
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	1.87
藜蘆	<i>Ligustici sinensis Rhizoma et Radix</i>	1.87
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	1.87
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	1.87
白朮	<i>Atractylodes Rhizoma alba</i>	1.87
紅花	<i>Cartami Flos</i>	0.75
Total amount		75.47

3) 시약 및 기기

본 연구에 사용한 시약은 Bovine type II collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate (MTX), 생리식

염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, trypan blue, ethyl ether, collagenase, diethyl pyrocarbonate (DEPC), tris Base, RPMI1640, trypsin-0.2% EDTA, 2,7-dichlorodihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma (U.S.A.), IgG, IgM, Collagen II 항체 kit는 Scientific Pierce (U.S.A.), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone (U.S.A.), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco (U.S.A.), PE-anti-CD3e, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, FITC-anti-CD23, FITC-anti-MHC II, FITC-anti-CD44 등은 BD-Pharm-ingen (U.S.A.) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (Daewoong Co., Korea), microwave oven (LG Co., Korea), flow cytometer (Becton Dickinson Co., U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), centrifuge (Hanil Co., Korea), deep freezer (Sanyo Co., Japan), heating block, ice-maker (Vision Co., Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-114 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), autoclave (Sanyo Co., Japan), imager system (Kodak Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-line Co., U.S.A.), ELISA Reader (Molecular devices Co., U.S.A.) 및 homogenizer (OMNI Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

GJ9 2첩 분량 (150.94 g)에 각각 증류수 2,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 24 g을 얻었으며, -80°C로 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs로 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다.

배양 후 GJ9 (최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 μg/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산 완충용액 (PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μl를 가하여 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액 (1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 μl를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1%

acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base (100 μ l)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker 에서 3.5 speed로 5분간 흔들여 준 후 ELISA reader 로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 기능 (LFT : liver function test) 측정

실험 종료 후 심장 채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 검사기관인 biototech (Co., Ltd.) (Cheongwon, Chungcheongbuk-do)에 의뢰하여 혈액 생화학 분석기 (Biochemistry analyer hitachi 7080 Co., Japan)를 사용하여 ALT, AST를 측정하였다.

3) Collagen 유발 관절염 생쥐 모델

Collagen 유발 관절염 (이하 CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete freund's adjuvant를 혼합한 후 200 μ g를 DBA/1J 생쥐의 꼬리 기저부의 피하에 주사하고, 21일 후 동량을 피하주사로 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 정상군과 대조군, 양성대조군, GJ9 약물을 투여한 실험군으로 나누어 실시하였다.

4) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 하여 정상군 (Normal, Nr), 대조군 (Control, CT), 양성대조군 (Methotrexate, MTX) (0.3 mg/kg), GJ9 실험군 (10.0 mg/kg)으로 나누어 booster 한 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, MTX군 (0.3 mg/kg)은 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 복강에 주사하였으며, GJ9 실험군은 10.0 mg/kg 농도로 4주 동안 매일 오전 11시에 경구 투여하였다.

5) Arthritis index 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도(표)를 1주일에 1회씩 검사하였다(Table 2).

Table 2. Arthritis Index(AI)

Score degree	Manifestation
0	No arthritis
1	Small degree of arthritis
2	Light swelling
3	Medium swelling
4	Severe swelling

6) Draining lymph node, paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 draining lymph node (이하 DLN) 및 paw joint를 적출하였다. DLN은 100 mesh로 세포를 분리한 후 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer (Falcon)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고, 37 $^{\circ}$ C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상층

액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

7) Draining lymph node, paw joint에서 형광 유세포 분석

총세포수 측정에서 나타난 바와 같이 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-B220를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 draining lymph node (DLN), paw joint에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

8) 혈청 내 rheumatoid factor 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자 방법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IgG와 IgM을 kit로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척하였다. 여기에 HRP-conjugated Avidin 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 세척하였다. 다시 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후 collagen II kit로 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 이를 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugated Avidin 100 μ l를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고, 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 병리 조직 검사

약물 투여 4주일 후에 각 실험군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세척하여 흐르는 물에 8시간 수세하였다. 이를 epoxy에 포맷한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson's Trichrome 염색을 수행하였다.

11) 통계처리

다양한 실험 결과는 SPSS 17.0 for window의 Student's t-test 분석 방법을 사용하여 통계처리 하였으며, p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 $100 \pm 5.8(\%)$ 로 나타난 반면, GJ9의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 투여군에서는 각각 85.7 ± 4.7 , 91.6 ± 3.1 , 90.5 ± 2.7 , 98.5 ± 4.6 , $101.2 \pm 2.8(\%)$ 로 나타났다(Fig. 1).

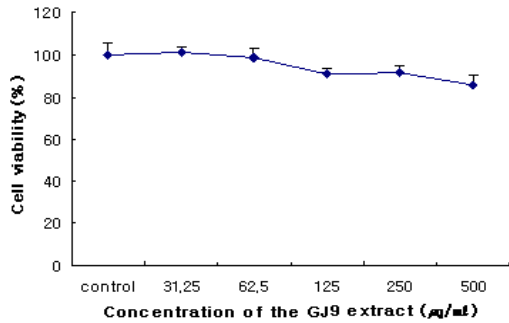


Fig. 1. Cytotoxicity of GJ9 on human fibroblast Cells (hFCs). Human fibroblast cells (hFCs) were treated with various concentration (31.25, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) of the GJ9 extract.

2. 간 기능에 미치는 영향

ALT는 정상군이 37.3 ± 2.4 (U/L), 대조군이 30.3 ± 1.6 (U/L), 양성대조군인 MTX에서는 155.7 ± 10.4 (U/L), GJ9 실험군에서는 29.5 ± 8.0 (I.U/L)로 나타났다. AST는 정상군, 대조군, 양성 대조군, GJ9 실험군에서 각각 101.1 ± 2.1 (U/L), 92.0 ± 10.7 (U/L), 109.4 ± 4.6 (U/L), 110.0 ± 3.6 (U/L)로 큰 차이는 없었다(Fig. 2).

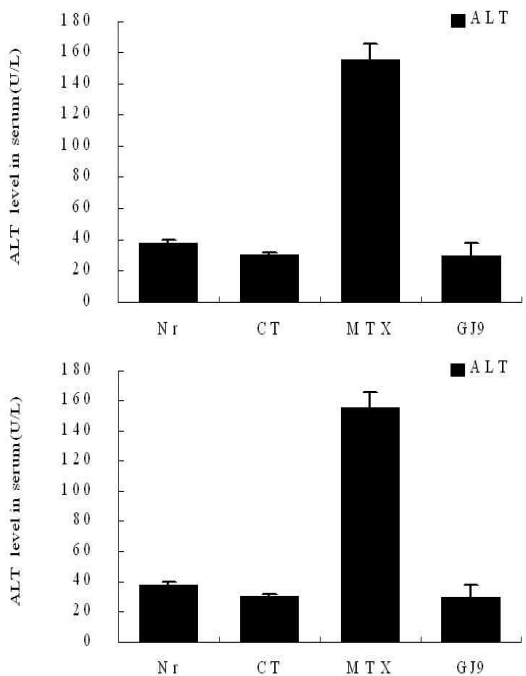


Fig. 2. Effect of GJ9 on the ALT and AST in CIA mouse. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group with distilled water oral treated, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and distilled water and treated, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated.

3. 관절염 유발에 미치는 영향

관절염 유발 지수를 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여부터 MTX 투여군과 GJ9 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였고, 3주와 4주부터 MTX 투여군과 GJ9 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 있는 ($*p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

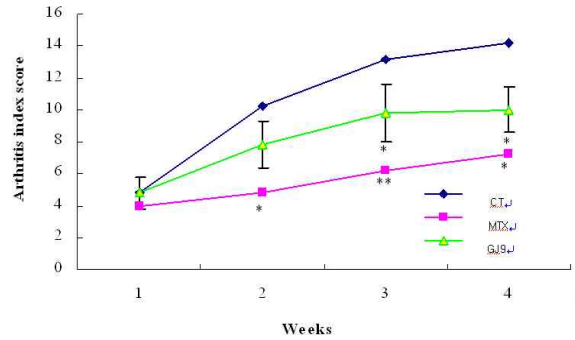


Fig. 3. Suppressive effect of GJ9 on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every 7 days interval. Following boosterization of collagen mice were divided into three groups. CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with CT by T test ($*p<0.05$, $**p<0.01$).

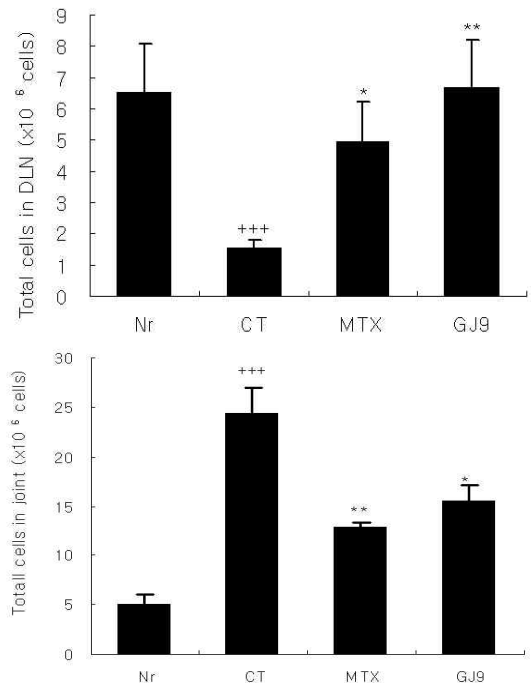


Fig. 4. Effect of GJ9 on total cell number of DLN and paw joint in CIA mice. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($+++p<0.001$). Statistically significant value compared with control by T test ($*p<0.05$, $**p<0.01$).

4. DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향

DLN에서는 정상군이 $6.5 \pm 1.60 (\times 10^6)$, 대조군이 $1.57 \pm 0.24 (\times 10^6)$, MTX 투여군이 $4.96 \pm 1.26 (\times 10^6)$, GJ9 실험군이 $6.70 \pm 1.50 (\times 10^6)$ 로 나타나, 이 역시 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 보였다(Fig. 4). Paw joint에서는 정상군이 $5.1 \pm 0.9 (\times 10^6)$, 대조군이 $24.3 \pm 2.7 (\times 10^6)$, MTX 투여군이 $12.9 \pm 0.3 (\times 10^6)$, GJ9 실험군이 $15.6 \pm 1.6 (\times 10^6)$ 로 나타나 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

5. 면역세포에 미치는 영향

1) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19⁺ 세포 발현

DLN에서 CD19⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $19.1 \pm 6.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $6.4 \pm 1.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $14.1 \pm 3.5 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $26.9 \pm 4.9 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 5).

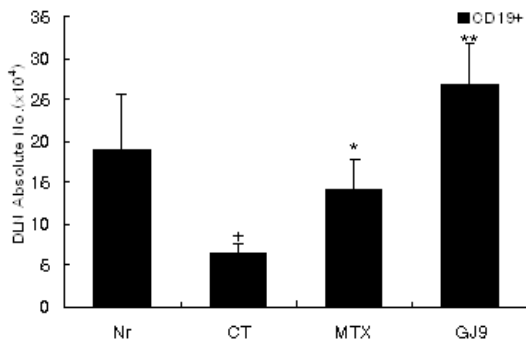


Fig. 5. Effects of GJ9 on absolute number of CD19⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD19⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($+p < 0.05$). Statistically significant value compared with control by T test ($+p < 0.05$, $++p < 0.01$)

(2) CD3⁺ 세포 발현

DLN에서 CD3⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $43.8 \pm 7.8 (\times 10^4)$, 대조군이 $7.7 \pm 1.4 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $30.6 \pm 5.6 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $38.1 \pm 5.9 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 6).

(3) CD4⁺ 세포 발현

DLN에서 CD4⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $31.7 \pm 7.3 (\times 10^4)$, 대조군이 $4.5 \pm 0.4 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $20.9 \pm 6.0 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $27.5 \pm 10.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 7).

(4) CD3⁺CD69⁺ 세포 발현

DLN에서 CD3⁺CD69⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute

number)로 산출한 결과, 정상군이 $3.9 \pm 1.4 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.6 \pm 0.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $5.1 \pm 1.1 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $3.7 \pm 0.8 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 8).

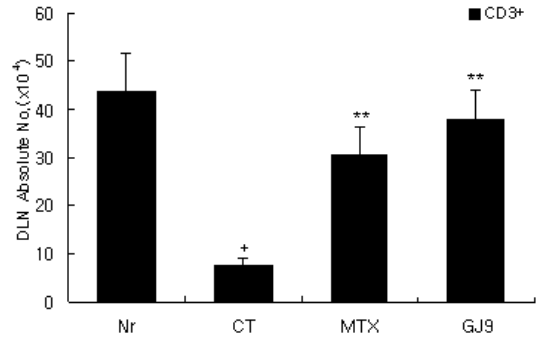


Fig. 6. Effects of GJ9 on absolute number of CD3⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD3⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($+p < 0.05$). Statistically significant value compared with control by T test ($++p < 0.01$).

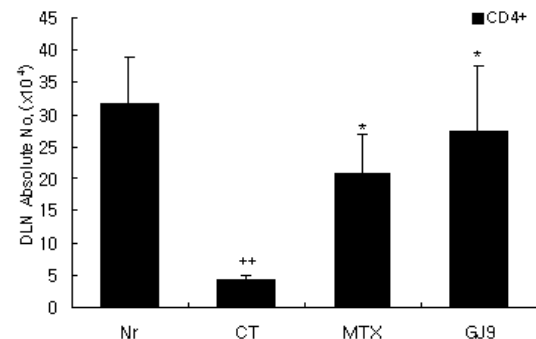


Fig. 7. Effects of GJ9 on absolute number of CD4⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD4⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($++p < 0.01$). Statistically significant value compared with control by T test ($+p < 0.05$).

(5) CD8⁺ 세포 발현

DLN에서 CD8⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $10.9 \pm 2.3 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.1 \pm 0.8 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $8.3 \pm 1.4 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $10.2 \pm 0.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 9).

(6) CD4⁺CD25⁺ 세포 발현

DLN에서 CD4⁺CD25⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $5.9 \pm 1.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.2 \pm 0.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $3.5 \pm 1.1 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $3.3 \pm 0.6 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성

($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 10).

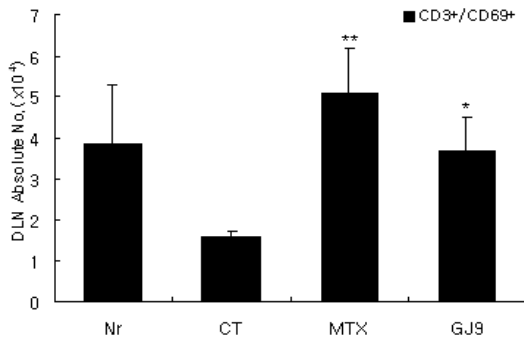


Fig. 8. Effects of GJ9 on absolute number of CD3⁺CD69⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD3⁺CD69⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with control by T test ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

number)로 산출한 결과, 정상군이 $1.46 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.8 \pm 0.7 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $1.7 \pm 0.7 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $1.3 \pm 0.7 (\times 10^4)$ 로 나타내었다(Fig. 13).

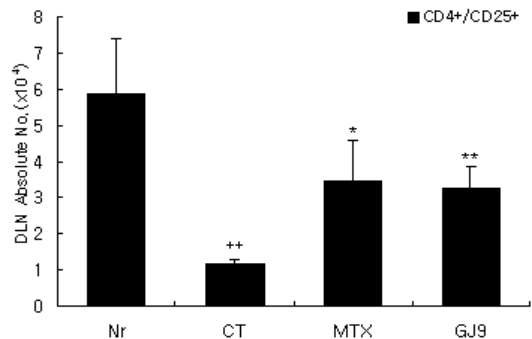


Fig. 10. Effects of GJ9 on absolute number of CD4⁺CD25⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD4⁺CD25⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($^{++}p < 0.01$). Statistically significant value compared with control by T test ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

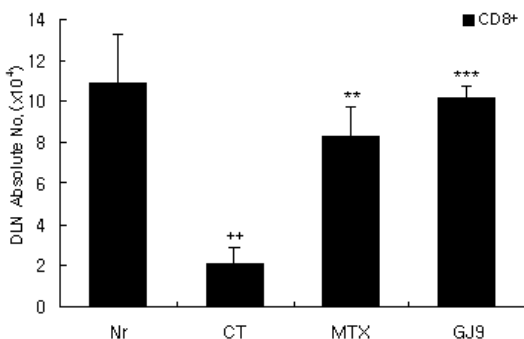


Fig. 9. Effects of GJ9 on absolute number of CD8⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD8⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($^{+++}p < 0.01$). Statistically significant value compared with control by T test ($^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$).

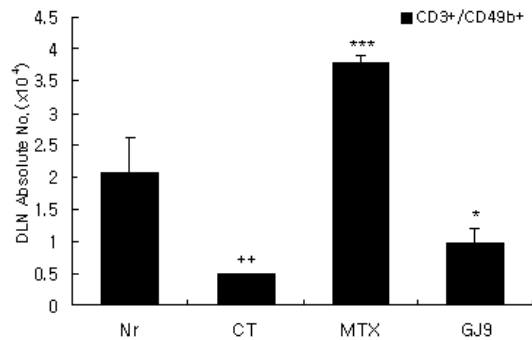


Fig. 11. Effects of GJ9 on absolute number of CD3⁺CD49b⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD3⁺CD49b⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($^{+++}p < 0.01$). Statistically significant value compared with control by T test ($^*p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$).

(7) CD3⁺CD49b⁺ 세포 발현

DLN에서 CD3⁺CD49b⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $2.1 \pm 0.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $0.5 \pm 0.0 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $3.8 \pm 0.1 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $1.0 \pm 0.2 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 11).

(8) CD4⁺CD44⁺ 세포 발현

DLN에서 CD4⁺CD44⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $18.3 \pm 4.7 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.7 \pm 0.2 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $13.0 \pm 2.6 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $15.5 \pm 2.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 12).

(9) CD11c⁺/MHCII⁺ 세포 발현

DLN에서 CD11c⁺/MHCII⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute

(10) B220⁺CD23⁺ 세포 발현

DLN에서 B220⁺CD23⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $8.0 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군이 $17.7 \pm 1.6 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $12.9 \pm 0.8 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $10.1 \pm 0.4 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 14).

(11) CD3⁺CD8⁺ 세포 발현

DLN에서 CD3⁺CD8⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $10.1 \pm 1.6 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.7 \pm 0.3 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $7.7 \pm 0.6 (\times 10^4)$, GJ9 실험군이 $10.1 \pm 0.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 15).

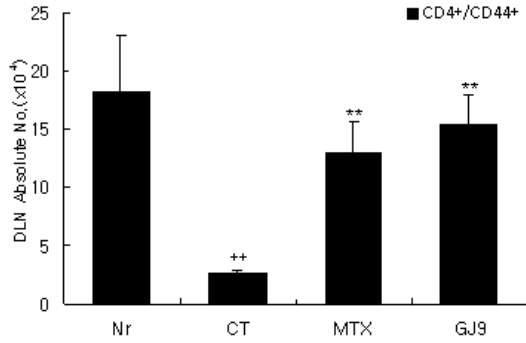


Fig. 12. Effects of GJ9 on absolute number of CD4⁺CD44⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD4⁺CD44⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (**p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

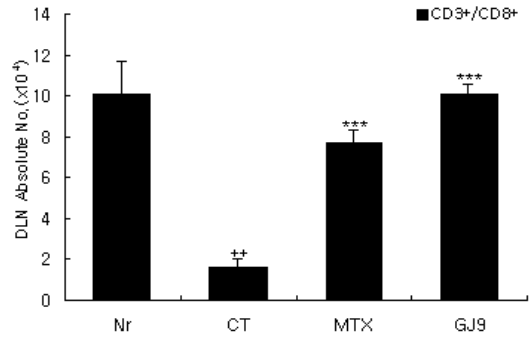


Fig. 15. Effects of GJ9 on absolute number of CD3⁺CD8⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD3⁺CD8⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (**p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (***)p<0.001).

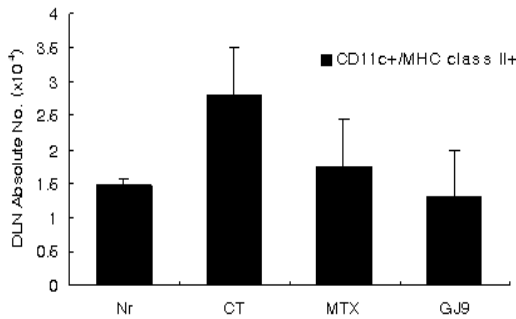


Fig. 13. Effects of GJ9 on absolute number of CD11c⁺/MHC II⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-CD11c⁺/MHC II⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated.

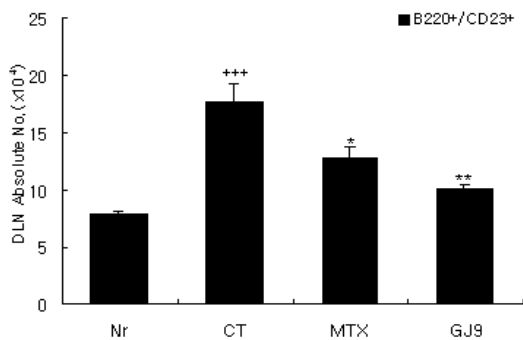


Fig. 14. Effects of GJ9 on absolute number of B220⁺CD23⁺ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GJ9. The cells were incubated with anti-B220⁺CD23⁺ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (***p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01).

3) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3⁺ 세포 발현

정상군이 $1.0 \pm 0.3 (\times 10^5)$, 대조군이 $31.1 \pm 2.0 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $4.6 \pm 0.5 (\times 10^5)$, GJ9 실험군이 $13.1 \pm 0.5 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p<0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 16).

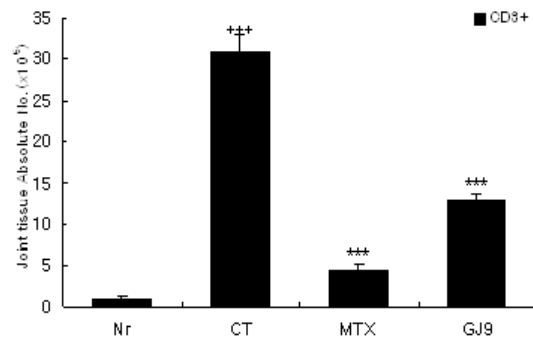


Fig. 16. Effects of GJ9 on absolute number of CD3⁺ cells in paw joint of CIA mice. Paw joint cells ($\times 10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of GJ9. Cells were incubated with anti-CD3⁺ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (***p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (***p<0.001).

(2) CD4⁺ 세포 발현

Paw joint에서 CD4⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $0.3 \pm 0.1 (\times 10^5)$, 대조군이 $19.5 \pm 0.5 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.1 \pm 0.2 (\times 10^5)$, GJ9 실험군이 $9.6 \pm 0.4 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p<0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 17).

(3) CD4⁺CD25⁺ 세포 발현

Paw joint에서 CD4⁺CD25⁺ 세포수를 절대세포수 (absolute

number)로 산출한 결과, 정상군이 $0.74 \pm 0.2 (\times 10^5)$, 대조군이 $2.41 \pm 0.1 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.34 \pm 0.2 (\times 10^5)$, GJ9 실험군이 $1.1 \pm 0.1 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 18).

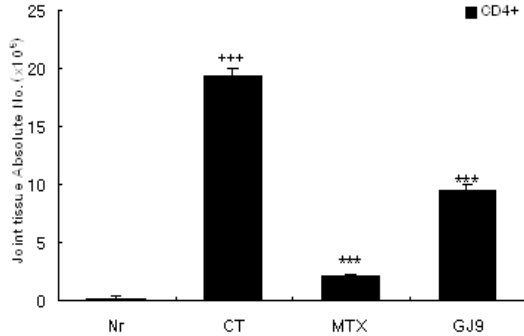


Fig. 17. Effects of GJ9 on absolute number of CD4⁺ cells in paw joint of CIA mice. Paw joint cells ($\times 10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of GJ9. Cells were incubated with anti-CD4⁺ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by T test (*** $p < 0.001$).

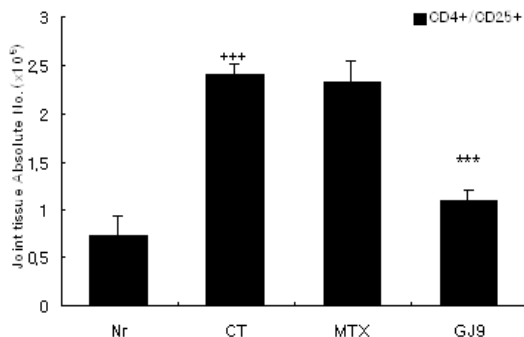


Fig. 18. Effects of GJ9 on absolute number of CD4⁺CD25⁺ cells in paw joint of CIA mice. Paw joint cells ($\times 10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of GJ9. Cells were incubated with anti-CD4⁺CD25⁺ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by T test (*** $p < 0.001$).

(4) CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 발현

정상군이 $1.6 \pm 0.2 (\times 10^5)$, 대조군이 $126.4 \pm 1.6 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $47.8 \pm 3.5 (\times 10^5)$, GJ9 실험군이 $68.0 \pm 6.6 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 19).

6. Rheumatoid factor에 미치는 영향

1) IgG 혈중 농도

IgG 혈중 농도는 정상군이 8.6 ± 4.0 (pg/ml), 대조군이

207.3 ± 43.7 (pg/ml), MTX 투여군이 106.0 ± 20.3 (pg/ml), GJ9 실험군이 91.7 ± 0.4 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 20).

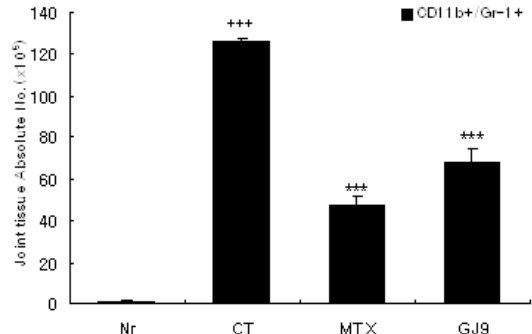


Fig. 19. Effects of GJ9 on absolute number of CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in paw joint of CIA mice. Paw joint cells ($\times 10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of GJ9. Cells were incubated with anti-CD11b⁺/Gr-1⁺ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by T test (*** $p < 0.001$).

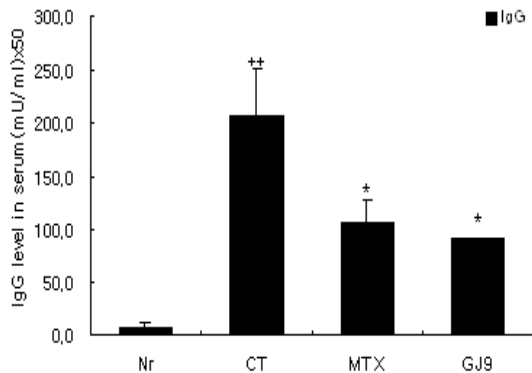


Fig. 20. Effects of GJ9 on levels of total IgG in the serum of CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++ $p < 0.01$). Statistically significant value compared with control by T test (* $p < 0.05$).

2) IgM 혈중 농도

IgM 혈중 농도는 정상군이 8.3 ± 3.1 (pg/ml), 대조군이 36.9 ± 2.5 (pg/ml), MTX 투여군이 31.2 ± 4.3 (pg/ml), GJ9 실험군이 10.5 ± 0.9 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 21).

7. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 1.1 ± 0.0 (U/ml), 대조군이 41.7 ± 0.9 (U/ml), MTX 투여군이 24.0 ± 2.5 (U/ml), GJ9 실험군

이 22.5 ± 3.1 (U/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 GJ9 실험군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 22).

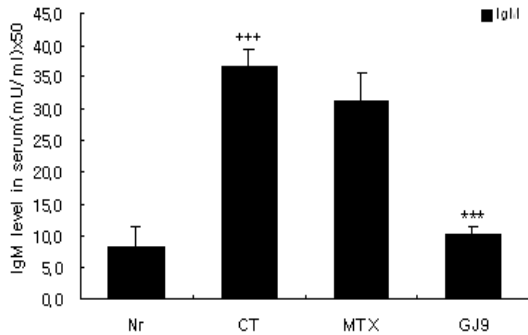


Fig. 21. Effects of GJ9 on levels of total IgM in the serum of CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by T test ($+++p < 0.001$).

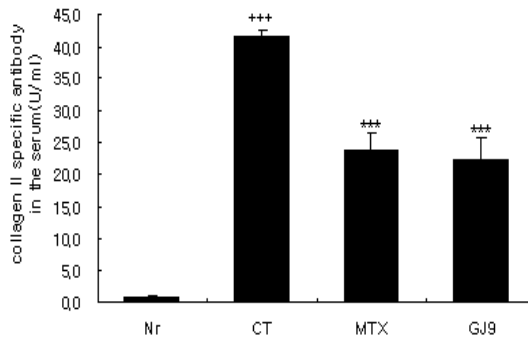


Fig. 22. Effects of GJ9 on levels of collagen II specific antibody in the serum of CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by T test ($+++p < 0.001$).

8. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GJ9를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다.

Fig. 23의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절에 염증 세포의 침윤과 활막세포의 증식이 진행된 반면, MTX군(Fig. 23. C)과 GJ9 실험군(Fig. 23. D)에서는 대조군에 비해 염증 세포의 침윤과 활막세포의 증식이 억제함을 관찰 할 수 있었다(Fig. 23).

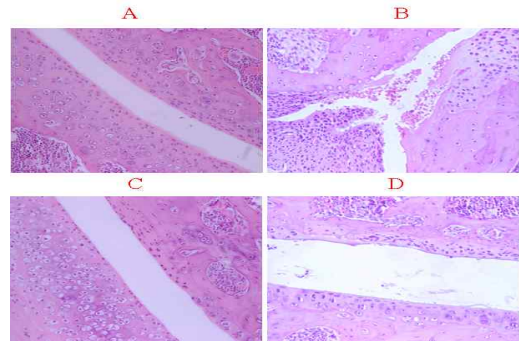


Fig. 23. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin. The degree of arthritis induced damage of joint of GJ9 group is slight compared with control group in histopathologic observation. Nr (Normal, A) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control, B) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate, C) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 (D) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications : $\times 200$

2) Masson's Trichrome 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GJ9를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 collagen deposition 염색인 Masson's Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다.

Fig. 24의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직에 collagen 침착이 진행된 반면, MTX군(Fig. 24. C)과 GJ9 실험군(Fig. 24. D)에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 24).

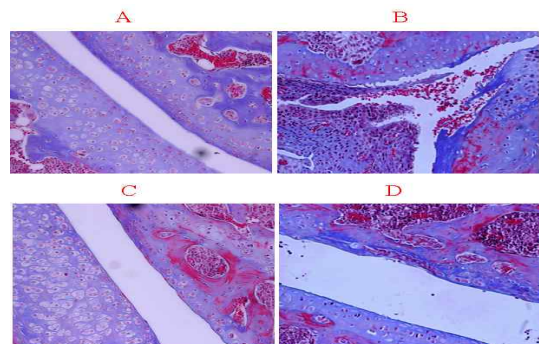


Fig. 24. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Masson's Trichrome staining. The degree of arthritis induced damage of joint of GJ9 group is slight compared with control group in histopathologic observation. Nr (Normal, A) : Normal DBA/1J mouse group, CT (Control, B) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection, MTX (methotrexate, C) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 0.3 mg/kg I.P injection, GJ9 (D) : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and 10.0 mg/day/0.2 ml oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications : $\times 200$

고 찰

류마티오이드 관절염은 원인 불명의 만성적인 전신성 질환으로, 관절이나 건의 활액에 비세균성 만성염증반응으로 초기에는

활액막이 증식하고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하며, 장기간 진행되면 관절의 연골과 관절주위 조직이 파괴되어 관절의 강직이나 변형이 지속될 수 있다¹⁵⁾.

류마티오이드 관절염의 병인과 병태생리에 대해서 명확한 결론이 없으나 현재 병인으로 가장 지지 받는 이론은 자가 면역 반응이며 초기 병변으로 미세혈관의 손상과 활액 세포의 수적 증가를 특징으로 한다¹⁶⁾.

최근, 다니엘 솔로몬(DANIEL H. Solomon)팀은 심혈관질환 위험인자와 류마티오이드 관절염의 관련 인자가 류마티오이드 관절염 환자의 심근경색, 뇌졸중 발병에 동일한 위험을 준다고 보고¹⁷⁾한 바에 알 수 있듯이 전신적인 건강에도 위협을 가한다.

류마티오이드 관절염의 면역 병리학적 기전은 단핵세포(monocyte)의 침윤과 염증이 발생한 활액막에서 CD4⁺, plasma cell, macrophage 등이 증가되며, 활액 내에 다양한 cytokine이 분비되는 세포성 면역체계의 작동과 동시에 antinuclearantibody, anti-collagen, anti-histone, anti-heat shock protein(HSP) 등에 의한 체액성 면역체계가 복합적인 작용을 일으켜 면역 연쇄 반응을 하기 때문이다^{18,19)}.

류마티오이드 관절염은 한의학적으로 痺症, 歷節風, 痛風, 白虎風, 鶴膝風, 風痺, 類風濕性關節炎 등의 병증에 속한다고 볼 수 있다^{3,20,21)}.

《素問·痺論》²²⁾에 “風寒濕三氣雜之, 合而爲痺也”라 한 이래 여러 문헌에서 痺症에 대해 언급하는데, 이러한 痺症의 범주에서 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風²³⁾ 등은 슬관절, 족관절, 주관절, 완관절 및 수족지 관절 등에 극심한 통증과 종대, 변형 등의 증상을 일으켜 결국 운동제한을 야기하는 질환으로 류마티오이드 관절염이나 통풍성 관절염의 임상 증상과 유사한 질환으로 여겨지고 있다.

류마티오이드 관절염의 치료법으로 서양의학에서는 휴식, 진통소염제, 스테로이드제 등을 사용했다가 류마티오이드 관절염이 면역질환임이 알려지면서 면역반응에 변화를 주는 약물로 금제제가 관절염 치료에 도입되었고, 이후 항말라리아제, 설파살라진 등이 도입되었다. 이후 메소트렉세이트(methotrexate : MTX)와 같은 면역억제제가 류마티오이드 관절염의 치료에 도입되면서 관절염 치료에 큰 발전을 가져왔다. 최근에는 분자생물학의 발전으로 인해 류마티오이드 관절염의 원인이 조금씩 밝혀짐에 따라 생물학적인 치료제가 개발되어 임상에서 이용되고 있다²⁴⁾. 최근 치료 개념은 ‘기회의 창(Windows of opportunity)’ 개념²⁵⁾과 ‘조기 적극적인 치료’ 전략으로서, 발병 초기부터 항류마티스 약제(DMARDs)를 적극적으로 사용하는 것이 관절 손상을 억제할 수 있으며 일반적으로 증상 시작 2년 이내를 기회의 창으로 말하고 있다.

항류마티스제제로 가장 선호되는 약물은 MTX로 스테로이드에 비해 전신적인 부작용이 적어 비교적 장기간 사용할 수 있는 장점이 있으나 일부 환자에서 간독성, 폐 섬유화, 골수억제, 구내염 등을 초래할 수 있으므로, 신기능 저하, 간질환, 심각한 폐질환 등이 있는 경우에는 이의 사용을 피하는 것이 좋다^{26,27)}. 또한 사용 중 정기적으로 CBC, LFT, creatinine을 추적 검사해야 한다²⁸⁾.

이렇듯 서양 의학의 류마티오이드 관절염 치료제는 아직 완전하지 않으며 부작용을 가지고 있으므로, 기존의 류마티오이드 관절염 치료제에 대한 부작용을 줄이거나 효용성을 높이려는 노력이 속출하면서 천연물 개발에 관심이 새롭게 모아지고 있는 실정이다²⁹⁾.

현대 한의학 분야에서도 류마티오이드 관절염 치료에 대한 동물 실험을 통한 약물 연구가 활발한데, 동물 실험 모델로 대표적인 것으로 adjuvant 유발 관절염과 collagen 유발 관절염이 있다. Type II collagen 유발 관절염은 Trentham 등⁴⁾에 의해 1977년에 처음 발표된 이후로, 인체에서 자가면역과 관련된 연구를 위해 널리 사용되고 있다.

Collagen 유발 관절염에 대한 처방으로는 疎風活血湯加味⁵⁾, 桂枝芍藥知母湯⁶⁾, 大羌活湯⁷⁾, 三痺湯⁸⁾ 등이 있는데, 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 조건을 비교하는데서 탈피하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다⁹⁾.

류마티오이드 관절염의 한방 약물 치료 개발 목적으로 기존의 실험결과에서 유효한 효과가 있었던 鷄血藤^{10,11)}, 豨薟¹²⁾, 玄胡索¹³⁾ 등의 한약물과 류마티스 질환의 특성상 발열, 종창의 증상에 대하여 淸熱瀉火, 燥濕시키는 蒼朮¹⁴⁾, 黃柏¹⁴⁾ 등을 추가하여 관절9호방이라 명명하고 실험적 연구를 시행하였다.

저자는 관절9호방이 류마티오이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, type II collagen으로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능에 미치는 영향, arthritis index, draining lymph node (DLN)와 paw joint 내 총세포수에 미치는 영향과 면역세포에 대한 형광 유세포 분석, 혈청 내 rheumatoid factor (RF) 분석, 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정, 조직학적 변화를 분석하였다.

GJ9의 세포독성 측정결과, 모든 농도에서 세포독성이 없었다(Fig. 1). AST(aspartate transaminase)와 ALT(alanine transaminase)는 주로 간에서 나오는 효소인데 반해서 AST는 심장, 골격근, 신장, 뇌에도 존재한다. 간질환이 있는 경우에는 약간씩이라도 이 두 효소들이 증가되는 경우가 많다. 심근경색인 경우에는 특징적으로 AST가 증가되며 근육질환에서도 이 효소가 증가될 수 있다. 반면에 ALT는 간질환이 있을 때에만 증가한다³³⁾.

간기능에 미치는 영향에서는, 양성대조군이 급격한 ALT의 상승을 보였음에 반해 GJ9 실험군은 큰 변화를 보이지 않았으며, AST 수치는 양성대조군과 GJ9 실험군 모두 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 여기서 GJ9가 양성대조군인 MTX에 비해 급성적인 간독성을 나타내지 않음을 추정해 볼 수 있다.

관절염 유발에 관한 실험결과, 시료 투여 2주부터 MTX 투여군과 GJ9 실험군에서 대조군에 비해 감소함을 보였고, 3주부터 GJ9 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타낸 반면, paw joint에서는 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유

의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

위의 결과는 GJ9 실험군이 DLN에서 면역 세포의 불균형을 조절하여서 정상 쥐와 비슷한 세포수를 유지하며 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포가 관절로 유입되는 것을 억제할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

면역시스템은 크게 체액성면역과 세포성면역으로 구분되고 있으며 현대적 실험연구는 항체가 관여하지 않고 T 세포가 중심이 되는 세포성 면역을 중심으로 연구되고 있는데, 이와 관련된 세포는 크게 T 세포, B 세포 및 macrophage 등으로 나눌 수 있으며, 면역반응은 이들 세포의 상호관계에 의하여 일어난다고 볼 수 있다^{31,32}.

주로 혈관변화, 부종 및 호중구의 침윤을 동반하는 급성 염증과는 대조적으로 만성 염증의 가장 중요한 특징적 소견은 대식세포 림프구 및 형질세포의 침윤, 섬유모세포와 소혈관의 증식, 섬유화 및 조직의 파괴 등이다³³. 만성 염증성 질환의 하나인 류마티드 관절염에서도 활액막에 활액세포가 증식하고, 많은 림프구와 어느 정도의 형질세포 그리고 대식세포가 침윤된다².

가장 많이 침착하는 세포는 T 림프구이다. T 림프구는 표면 marker와 작용의 차이에 의해 두 가지 아집단, 즉 림프구의 활성화를 촉진하는 CD4⁺ Th림프구와 표적세포를 파괴하는 CD8⁺ Tc림프구로 나누어지며 이들은 각각 MHC class II 항원, MHC class I 항원에 구속되어 항원을 식별하는 T 세포 수용체를 가진다^{31,32}.

CD19⁺ 세포는 B 세포의 수를 측정하는데 주로 사용하며, 항체를 직접 생산하여 외부물질을 중화시키는 체액성 면역반응에 관여한다. 또한 CD19⁺는 B 세포에 있고 B 세포 리셉터의 협조자(co-B cell receptor)로서 CD21⁺과 복합체를 이루어 신호 형질유입의 역할을 하고, B 세포의 발달 초기부터 형질세포(plasma cell)의 최종 분화까지 발현 된다³⁴.

CD3⁺ 세포는 T 세포 수용체(TcR)에 결합하여 항원인식 신호에 따르는 신호를 세포핵에 전달하는 중요한 역할을 맡고 있다³⁵.

CD4⁺ T 세포는 보조 T 세포(helper T cell)이고, CD8⁺ T 세포는 억제 T 세포 또는 세포독성 T 세포로 CD4⁺, CD8⁺은 T 림프구를 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있으나 모든 T 세포 표면에 표현되는 표식인자로 CD3⁺가 있다³². 말초 T 림프구는 CD4⁺와 CD8⁺ 중 하나만 가진다³².

CD3⁺ 세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 있으며, CD69⁺는 휴지기 임파절에서는 발현되지 않지만, T 세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화인자로 불리는 세포표면 단백질이며, 활성화된 T 세포 및 B 세포, 대식세포, NK 세포에서도 발현이 된다^{34,35}. T 세포와 내피세포 간의 상호작용에 있어서 T 세포를 활성화시키는 데 CD69⁺ 같은 다양한 표면 표시 인자들의 발현이 증가된다³⁴.

본 연구에서 CD19⁺, CD3⁺CD69⁺, CD8⁺ 및 CD3⁺CD8⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고(Fig. 5, 8, 9, 15), 또한 CD3⁺와 CD4⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서는 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가한 반면 paw joint에서는 유의성 있게 감

소하였다(Fig. 6, 7, 16, 17).

위의 결과는 GJ9 실험군이 DLN에서 세포발현이 증가하는 경향을 보여 조절 T 세포의 활성을 증가시키는 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 GJ9 실험군이 paw joint에서 세포발현이 감소하는 경향을 보여 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포들이 관절로 유입되는 것을 억제하는 것으로 보인다.

CD4⁺CD25⁺ T 세포는 자가면역을 방지하는 역할을 하는 regulatory T cell로 알려져 있다. 이러한 regulatory T cell의 존재는 조직에서 자가 면역을 일어나지 않게 하는 기능뿐만 아니라, 부적절한 조직의 제거에 있어서 자가 면역을 허용하는 기능까지 포함하고 있다³⁶.

B 세포에서는 높은 수준의 CD44⁺ 세포가 나타나며 이러한 CD44⁺ 세포는 DLN 조직들이 제자리를 찾아오게 하는 중간에 반응하는데 그 표면에서 반응한다¹. 또한 CD49b⁺ 세포는 자가 항원에 감작된 미성숙 수지상 세포에 의해서 활성화 되고 증식되는 세포로서 RA와 같은 자가 면역성 질환의 억제 작용을 나타내는 것으로 보고되었다³⁷.

CD23⁺ 세포는 알레르기 비염이나 알레르기 천식 등 알레르기 질환에서 IgE 생성 및 염증반응에 연관된다. 항원에 의해 유도되는 IgE 합성이 알레르기 질환의 중심적 양상이고, 뒤따르는 IgE와 항원의 상호작용은 알레르기에 연관된 증상과 관계있다. IgE 생성은 다양한 활성을 보이는 세포표면분자 CD23⁺에 의해 조절된다. CD23⁺을 통한 allergen-loaded IgE에 의해 세포들이 활성화되면 IL-1, IL-6, TNF-α가 생성된다³⁸. B220⁺ 세포는 사람에게는 없지만 생쥐의 B 세포 표면에 있는 표식자이다³². 특히 CD4⁺CD25⁺ 세포와 CD49b⁺ 세포는 조절 T 세포로서 이들이 활성화된 T 세포 면역 체계를 조절한다고 알려져 있다^{37,39}.

본 연구에서 CD3⁺CD49b⁺, CD4⁺CD44⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고(Fig. 11, 12, 14), CD4⁺CD25⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서는 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가한 반면 paw joint에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10, 18).

위의 결과는 GJ9 실험군의 세포 발현이 DLN에서 증가하며 paw joint에서 감소하는 것으로 보아 GJ9 투여가 조절 T 세포의 활성을 감소시키는 것으로 보인다.

본 연구에서 B220⁺CD23⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서 GJ9 실험군이 대조군의 결과에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 14).

CD11a⁺는 백혈구에서 발현되고, CD18⁺과 짝을 이루며 부착과 세포의 이동작용을 한다. CD11b⁺는 단핵세포, 과립구, NK세포에서 발현되는 세포표면분자로서, 이 세포들은 염증 시에 제일 먼저 도착하는 혈구들로 신체에 침투한 항원에 대한 탐식작용이 기본 기능이다⁴⁰. 또한 류마티드 관절염 환자의 활막조직에서는 염증반응으로 인하여 CD11b⁺의 발현이 증가되어 있다고 보고되고 있다⁴¹. Gr-1⁺에 강한 양성반응을 보이는 세포들은 과립 백혈구들이다⁴⁰. CD11c⁺는 사이토카인의 생성을 차단한다고 알려져 있다⁴².

본 연구에서 CD11c⁺/MHCII⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 DLN에서 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고(Fig. 13), CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 발현을 측정된 결과 paw joint에서 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 19).

위의 결과는 관절염이 발생한 관절 조직에서는 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 수가 급격하게 감소한 것으로 보아 GJ9가 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제하는 것으로 보인다.

류마티오이드 관절염 환자의 B 림프구는 혈청이나 관절 내에서 자가항체인 IgG, IgM 등과 항원에 따른 항체를 분비하며, 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로불린의 Fc 부위에 대한 자가항체인 류마티오이드 인자를 생성한다. 일단 IgG와 RF가 항원 항체 복합물을 형성하면 보체를 활성화시키는 화학 매개물이 방출되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활막세포 파괴와 염증반응을 일으킨다⁴³⁾. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체 내에서 류마티오이드 관절염의 활동성과 관련한 지표가 되며, 이중 IgM-RF는 류마티오이드 관절염 환자의 2/3에서 양성으로 나타나며, 측정이 용이하여 임상에서 주로 이용된다⁴⁴⁾.

본 실험에서 IgG와 IgM의 혈중 농도는 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어 GJ9에 의하여 면역반응이 억제 조절되었음을 알 수 있었다(Fig. 20, 21).

본 실험에서 collagen II 항체량은 GJ9 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 22).

류마티오이드 관절염에서 주요 병리적 징후는 proinflammatory cytokine에 의해 자극받고 MMPs에 의해 관절에 염증이 발생하고 연골의 골 흡수가 형성되는 것이다. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연접부 침식에 의해 발생한다. 이는 주로 IL-1, TNF- α 등의 염증 전구 cytokine에 반응한 대식세포나 섬유세포에 의해 생산되는 MMPs (주로 collagenase인 MMP-1, stromelysin인 MMP-3)에 의해 파괴된다⁴⁵⁾.

Hematoxylin & Eosin 염색은 조직의 구조를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰한 결과 GJ9 실험군에서 대조군에 비하여 염증의 침윤과 활막세포의 증식이 감소하였다(Fig. 23).

Masson's Trichrome 염색은 교원섬유의 축적정도를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰한 결과 GJ9 실험군에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 감소하였다(Fig. 24).

이상의 결과로 보아 관절9호방은 DLN에서 세포발현이 증가하는 경향을 보여 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주고, paw joint에서 세포발현이 감소하는 경향을 보여 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포들이 관절로 유입되는 것을 억제하는 것으로 보였다. 또한 조직학적 방법을 통하여 육안으로 관절강내를 관찰한 결과 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하여 염증 세포의 침윤과 활막세포의 증식이 억제될

을 관찰 할 수 있었다.

최근 임상에서 다용하고 있는 MTX에 비하여 간독성과 세포독성이 없었으며, 전신의 면역 기능을 억제하지 않으면서도 paw joint 내의 면역 반응을 감소시키는 결과가 있어 향후 류마티오이드 관절염 치료에 좋은 효과가 기대된다.

향후 이에 대한 지속적 연구와 임상적 응용이 뒷받침 된다면 MTX 등의 항류마티스 약제의 부작용을 줄이면서도 효과를 높일 수 있는 매우 안정적인 한약물 치료제로서 사용 될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

관절9호방이 류마티오이드 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 collagen II 로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능, arthritis index, DLN 및 paw joint 내 총세포수, 면역세포, 혈청 내 rheumatoid factor 및 조직학적 변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

세포독성 및 간독성은 나타나지 않았다. 관절염 지수는 유의성 있게 감소하였다. DLN 및 paw joint의 총세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 유의성 있게 증가하였고 paw joint에서는 유의성 있게 감소하였다. 림프 내 CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD49b⁺, CD4⁺CD44⁺ 발현은 유의성 있게 증가하였고, B220⁺CD23⁺ 발현은 유의성 있게 감소하였다. 관절 내 CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 발현은 유의성 있게 감소하였다. 혈청 내 IgG과 IgM은 유의성 있게 감소하였다. 혈청 내 collagen II 항체량은 유의성 있게 감소하였다. 조직학적으로 관찰한 결과, 관절 주변에서 염증 세포의 침윤, 활막 세포의 증식, 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 및 활막세포의 손상이 감소하였다.

이상의 결과로 보아 관절9호방은 collagen II로 유발된 관절염 억제에 유효하며, 향후 류마티오이드 관절염에 대한 임상적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 헤리슨 면역 편찬위원회. 헤리슨 내과학. 서울, 정담출판사, pp 2148-2157, 2006.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 제5판. 서울, 최신의학사, pp 175-176, 2005.
3. 한방재활의학회. 한방재활의학회. 서울, 군자출판사, pp 78-99, 2005.
4. Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med. 146(3):857-868, 1977.
5. 박중문, 오민석, 박중오, 김동희. 疎風活血湯加味方이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 관한 연구. 동의생리병리학회지 16(4):810-817, 2002.
6. 신병희, 이종수, 신현대. 桂枝芍藥知母湯이 제II형 collagen

- 유발 관절염의 항체에 미치는 영향. 동의물리요법과학회지 4(1):121-131, 1994.
7. 이호근, 정석희, 김성수. 大羌活湯이 제II형 collagen 유발 관절염의 항체에 미치는 영향. 동의물리요법과학회지 4(1):87-94, 1994.
 8. 정수현, 김순중. 三痺湯이 collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과과학회지 10(1):173-183, 2000.
 9. 유호상. 관절염에 관한 한의학 석·박 논문 73편에 대한 분석. 대전대학교대학원. 2001.
 10. 최정식, 송태원. 鷄血藤이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 관한 연구. 대한보초학회지 18(3):79-88, 2003.
 11. 서해경, 오민석, 김동희. 류마티스 관절염 환자 활막세포에 대한 鷄血藤의 면역반응. 동의생리병리학회지 17(3):780-786, 2003.
 12. 조영주, 김성훈, 박종오, 김동희. 豨薟이 RA 병태 모델에서 관련인자 및 조직학적 변화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(2):403-411, 2003.
 13. 박동석, 안병철, 안춘재. 玄胡索, 유향 및 몰약 약침 자극이 진통효과에 미치는 영향. 대한침구학회지 11(1):145-158, 1994.
 14. Aletaha, D., Landewe, R., Karonitsch, T., Bathon, J., Boers, M., Bombardier, C., Bombardieri, S., Choi, H., Combe, B., Dougados, M., Emery, P., Gomez-Reino J., Keystone, E., Koch, G., Kvien, T.K., Martin-Mola E., Matucci-Cerinic M., Michaud, K., O'dell J., Paulus, H., Pincus, T., Richards, P., Simon, L., Siegel, J., Smolen, J.S., Sokka, T., Strand, V., Tugwell, P., van der Heijde D., van Riel P., Vlad, S., van Vollenhoven R., Ward, M., Weinblatt, M., Wells, G., White, B., Wolfe, F., Zhang, B., Zink, A., Felson, D. Reporting disease activity in clinical trials of patients with rheumatoid arthritis: EULAR/ACR collaborative recommendations. *Arthritis and rheumatism*. 59(10):1371-1377, 2008.
 15. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 85, 1672, 1166-1170, 1997.
 16. Lee Goldman, Dennis Ausiello, J. Claude Bennett. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia:WA Saunders company. pp 1508-1515, 1992.
 17. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당, pp 138-140, 209-211, 2001.
 18. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. Cellular and Molecular Immunology. 서울, 범문사, p 85, 423, 2004.
 19. Varbanova, B.B., Baleva, M., Nikolov, K., Mihailova, D. Prevalence of IgM, IgA and IgG-Rheumatoid Factors in Seronegative Polyarticular Disease Compared to Pauciarticular Disease in Juvenile Chronic Arthritis as Measured by ELISA, *Adv. Exp. Med. Biol.* 455: 61-68, 1999.
 20. 張 機. 金匱要略. 서울, 成輔社, pp 117-119, 1985.
 21. 朱震亨. 丹溪心法附錄. 서울, 大星文化社, pp 14-21, 1982.
 22. 楊維傑 編著. 黃帝內經素問譯解. 台北市, 台聯國風出版社, pp 95-96, 328-336, 1984.
 23. 허 준. 동의보감. 서울, 남산당, pp 365-378, 1989.
 24. 양형인. 류마티스 관절염의 최신 치료. 서울, 경희의학, 20(1): 1-3, 2004.
 25. Boers, M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48(7):1771-1774, 2003.
 26. 이연아, 홍승재. 류마티스 관절염의 최신치료 지견. 서울, 경희의학, 23(1):7-14, 2007.
 27. Alarcon, G.S., Kremer, J.M., Macaluso, M., Weinblatt, M.E., Cannon, G.W., Palmer, W.R., St Clair, E.W., Sundy, J.S., Alexander, R.W., Smith, G.J., Axiotis, C.A. Risk factors for methotrexate-induced lung injury in patients with rheumatoid arthritis. A multicenter. case-control study. Methotrexate Lung Study Group. *Ann Intern Med.* 127(5):356-364, 1997.
 28. Li, E., Brooks, P., Conaghan, P.G. Disease-modifying antirheumatic drugs. *Curr Opin Rheumatol.* 10(3):159-168, 1998.
 29. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지 21(4):177-196, 2004.
 30. 이삼열, 정운섭, 송경순 권오현. 임상병리검사법. 서울, 연세대학교 출판부, p 264, 1996.
 31. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학 강의. 대구, 경북대학교 출판부, pp 10, 22, 25, 77, 193, 200, 215, 248, 357, 211-212, 232-235, 1996.
 32. 김세중. 면역학. 서울, 고려의학, pp 3, 8, 18, 25-32, 114, 134, 148-150, 157-158, 206, 1994.
 33. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 85, 167-173, 1166-1170, 1997.
 34. Varbanova, B.B., et al. Clinical immunology. New York, Mosby, 4: 13, 6: 18, 2001.
 35. 타다 토미오. 면역의 의미론. 서울, 한울, p 103, 2007.
 36. Jonathan, K., Tal, M., Ehud, H., Iftach, S., Ethan, S. and Michal, S. Naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *The National Academy of Sciences.* 99(24):15620-15625, 2002.
 37. Charbonnier, L.M., van Duivenvoorde, L.M., Apparailly, F., Cantos, C., Han, W.G., Noël, D., Duperray, C., Huizinga, T.W., Toes, R.E., Jorgensen, C., Louis-Plence P. Immature dendritic cell suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b⁺ regulatory T cell. *J Immunol.* 177(6):3806-3813, 2006.
 38. Rosenwasser, L.J., Busse, W.W., Lizambri, R.G., Olejnik, T.A., Totoritis, M.C. Allergic asthma and an anti-CD23⁺ mAb(IDEC-152). results of a phase I. single-dose.

- dose-escalating clinical trial. *J Allergy Clin Immunol.* 112(3):563-570, 2003.
39. Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., Rudensky, A. Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol.* 3(1):33-41, 2002.
40. Mosby international Ltd.. *Crash Course. Immune blood and Lymphatic Systems.* 서울, 한우리, pp 17-21, 2000.
41. Johnson, B.A., Haines, G.K., Harlow, L.A., Koch, A.E. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 36(2):137-146, 1993.
42. 박소영, 강대영. CD11c⁺항체가 Lipopolysaccharide에 의한 국소적 Shwartzman 반응의 유발에 미치는 영향. *충남의대잡지.* 27(2):169-182, 2000.
43. 김세윤. 류마티스 진료. 서울, 군자출판사, p 219, 2001.
44. 이규범. 임상병리헨드북. 서울, 고문사, pp 233-235, 2003.
45. Guo, C., Piacentini, L. Type I Collagen-induced MMP-2 Activation Coincides with Up-regulation of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase and TIMP-2 in Cardiac Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(47):46699-46708, 2003.