

氣血關節方A(CWS-A)가 CFA로誘發된關節炎에 미치는影響

나창수¹, 윤대환¹, 김정상², 채우석^{3*}

1 : 동신대학교 한의과대학 경혈학교실, 2 : 해부학교실, 3 : 침구학교실

The effect of Gihyeolgwanjeolbang-A(CWS-A) on adjuvant-induced arthritis in rats

Changsu Na¹, Daehwan Youn¹, Jeongsang Kim², Wooseok Chae^{3*}

1 : Dept. of Acupoint & Meridian, 2 : Anatomy, 3 : Acupuncture, Oriental Medical School, Dongshin University

ABSTRACT

Objective : To investigate effects of herbal preparations formulated(Gihyeolgwanjeolbang-A, CWS-A) on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats.

Method : Arthritis was induced by injecting CFA subcutaneously into the left knee joint and paw, and the herbal preparations formulated(CWS-A I, 82.3 mg/kg; CWS-A II, 164.6 mg/kg) was administered orally (i.g.) for 10 consecutive days beginning on day 10 after the injection. External shape, paw edema, inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1beta), and histological observation were assessed.

Result : In swelling of the paw, CWS-A I and CWS-A II group in 15 days and 20 days were significantly reduced compared to controls. In serum ALT, CWS-A I and CWS-A II group were significantly reduced compared to controls. In TNF- α , CWS-A I and CWS-A II group were a tendency reduced compared to controls. In HGB, HCT, MCHC of erythrocytes, CWS-A II group was increased compared to controls. In histological observations, CWS-A II group was observed synoviocytes more than control group and was observed proteoglycans in the deep layers.

Conclusion : The data suggest that CWS-A significant anti-arthritic effects that may be mediated by suppressing inflammatory parameters.

Key words : Arthritis, complete Freund's adjuvant (CFA), herbal preparations, serum and blood parameters, histological observation

서론

관절은 내면에 연골과 활막, 연골하에는 뼈를 지니고 활막 외에도 관절포, 뼈, 근육, 건, 인대가 접하고 언제나 운동에 의한 기계적 자극을 받고 있어서 염증을 일으킨다. 염증의 원인으로서는 감염, 외상, 알리지, 대사이상 등이 있으며, 퇴행변성에 이어서 염증을 일으킨다. 관절염의 공통 증상으로는 관절의 종창, 동통, 국소열감, 관절기능장애 등이고 병리학적으로는 활막에 대한 세포침윤, 부종, 결합조직의 증식 등이 있다¹⁾.

인체에 발생하는 관절질환은 발병의 원인, 진행속도, 발생된 관절부위 등에 따라 퇴행성, 류마티스성, 화농성, 결핵성 및 통풍성 관절염 등으로 구분하며, 이 중 류마티스성 관절염은

관절 활액막의 염증, 증식으로 인한 관절의 부종과 동통이 대표적인 증상이 나타나고, 진행되면 관절의 연골, 뼈, 주위조직의 파괴로 인한 강직이나 변형이 동반된다. 세계 인구의 1~2%에서 발견되고, 여성이 남성보다 2~4배 많이 발생된다^{2,3)}.

한의학에서 관절염은 痺證, 痺痛, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風 등과 같은 병증을 포괄한 것이라 할 수 있으며, 발생 원인으로서는 風寒濕의 外邪 침입과 肝腎의 虛損이 주요한 원인으로 祛風散寒, 除濕清熱, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 治法이 활용되고 있다⁴⁾.

근래 한의계에서 관절 질환의 치료에 활용되는 방제는 다양한데, 최³⁾는 관절질환에 대한 한의학 치료 동향에 관한 연구에서 총 70편의 논문을 주제별로 나누었을 때 방제에 관한

*교신저자 : 채우석, 동신대학교 한의과대학 침구학교실,
· Tel : 062-350-7800, · E-mail : chaewose@dsh.ac.kr,
· 접수 : 2011년 12월 15일 · 수정 : 2012년 1월 3일 · 채택 : 2012년 1월 13일

것이 24편으로 가장 많았고, 사용된 방제의 주요 효능은 祛風濕, 止痺痛, 活血祛瘀 등이었고, 염증 유발 사이토카인 및 면역 관련 인자를 파악함으로써 작용 기전을 파악하고자 하는 경향이 두드러짐을 보고하였다.

氣血關節方A(CWS-A)은 強筋骨, 利水排膿, 清熱燥濕, 理氣止痛, 行氣血, 活血破瘀, 滋補肝腎 등의 효능을 가지고 있는 玄胡索, 三七根, 杜冲, 牛膝, 鹿茸, 黃芪 등 17가지의 한약재로 구성된 처방으로 관절염을 치료하기 위한 創案方이다.

Adjuvant 유발 관절염은 Pearson⁶⁾에 의해 류마티드 관절염 동물모델로 고안된 실험적 질환으로, 근래 한약제제의 관절염 효능 연구에도 다수 응용되고 있다^{7~12)}.

이를 바탕으로 하여 Complete Freund's Adjuvant로 유발된 관절염 모델에게 관절질환 개선 한약배합제제 CWS-A를 투여하여 어떠한 효능을 나타내고 있는지를 형태계측학적, 혈액학적, 면역학적 및 병리조직학적인 분석을 통하여 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 동물

체중이 약 200~210 g의 Sprague Dawley계의 백서를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 24~26 °C, 습도 40~60%)내에서 고형사료(Pellet, GMO, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안에도 물과 고형사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약물

본 실험에서 사용한 氣血關節方A (CWS-A)은 동신대학교 부속광주한방병원의 채우석교수가 창안한 처방으로 내용 및 생약명은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Gihyeolgwanjeolbang-A(CWS-A)

Herb Name	Pharmacognostic nomenclatures	Amount (g)
鹿茸	Cornu Cervi Pantotrichum	10.0
다시마	Laminaria Janponica	6.0
薏苡仁	Semen Coicis	6.0
黃栢	Cortex Phellodendri	6.0
玄胡索	Rhizoma Corydalis	5.0
三七根	Radix Notoginseng	5.0
丹蓼	Radix Salviae Miltiorrhizae	5.0
蓬朮	Rhizoma Zwoariae	5.0
杜冲	Cortex Eucommiae	5.0
牛膝 _{高蒸}	Radix Achyranthis Bidentatae	5.0
白芍藥	Radix Paeoniae Alba	4.0
牡丹皮	Cortex Moutan Radicis	4.0
香附子	Rhizoma Cyperi	4.0
薑黃	Rhizoma Curcumae Longae	4.0
當歸 _{高蒸}	Radix Angelicae Sinens	4.0
黃芪	Radix Astragali	4.0
白芥子	Semen Sinapis Albae	3.0
Totality		70.0

3) 검액

CWS-A 처방 20첩 분량을 증류수와 함께 180분간 전탕하여 얻어지 추출액 4,800 ml을 얻은 다음 원심분리기(Eppendorf, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 잔사를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음, 동결건조하여 최종적으로 CWS-A 197.13 g(수득율 11.60%)을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 군 분리

백서는 각각 정상군(Normal group, n=10), 관절염을 유발시킨 후 약물 처치를 하지 않은 대조군(Control group, n=10), 관절염을 유발시킨 후 CWS-A 82.3 mg/kg을 구강투여한 군(CWS-A I, n=11), CWS-A 164.6 mg/kg을 구강투여한 군(CWS-A II, n=11)으로 나누었다.

2) CFA 관절염 유발

관절염 1차 유발은 Complete Freund's Adjuvant(Sigma, St. Louis, MD, USA, CFA)로 백서의 왼쪽 슬관절에 Sterile Hypodermic syringe(Korea vaccine co, Korea)로 0.25ml 씩 투여하고, 10일 경과 후 2차 유발하였다. 2차 유발은CFA로 백서의 왼쪽 슬관절 아래 방향으로 Sterile Hypodermic syringe(Korea vaccine co, Korea)로 0.1ml 씩 투여하고 왼쪽 발바닥에 Sterile Hypodermic syringe(Korea vaccine co, Korea)로 0.08ml 씩 투여하였다.

3) 약물 투여

약물의 구강투여는 관절염 유발 후 10일째부터에 시작하였으며, 1일에 각 1회씩 총 10회에 걸쳐 시행되었다. 1회 투여량 167 μ l/kg을 주입하였다.

4) 발목이하 부종 측정

Isoflurane 2.5%과 O₂로 혼합된 가스 마취상태 하에서 Digital Plethymometer(LE7500, Panlab, Spain)를 이용해 백서의 발목이하 부종을 측정하였으며, 측정은 실험 시작전, 유발후 10일, 15일(약물투여후 5일), 20일(약물투여후 10일)에 각각 시행하였다.



Scheme 1. A picture of the scene to measure the paw edema of rats using Digital Plethymometer.

5) 족근관절(ankle joint) 두께 측정

Isoflurane 2.5%과 O₂로 혼합된 가스 마취상태 하에서 Digital Caliper(China)를 이용해 백서의 족근관절 두께를 측정하였으며, 측정은 시작전과 유발후 20일(약물투여후 10일)에 시행하였다.



Scheme 2. A picture of the scene to measure the thickness of ankle joints of rats using Digital Caliper.

6) 혈액 및 혈청학적 검사

채혈에 의하여 얻어진 혈액 중 약 100 μ l를 EDTA-bottle에 넣은 후 곧바로 Multispecies Hematology Analyser(950, Hemavet, USA)에 주입하여 Leukocytes, Erythrocytes, WBC, RBC, HGB, HCT를 측정하였다. 나머지 혈액은 고속원심분리기(Centricon T-42K, Italy)에서 3,500 rpm으로 20분간 시행하여 혈청을 분리하였으며, 혈청 분석으로는 AST와 ALT를 측정하였다.

7) TNF- α 측정

TNF- α 측정은 Rat TNF- α (Invitrogen, USA)를 사용하여 측정하였다. Rat TNF- α 가 coating된 microplate에 Rat TNF- α standard, serum, control 100 μ l를 첨가하고 plate cover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 실온에 2시간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Rt TNF- α Biotin Conjugate 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에 1시간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Streptavidin-HRP Working solution 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에 30분간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Stabilized Chromogen 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온(dark상태) 30분간 방치하였다. Stop solution 100 μ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 Spectramax(M2, Molecular Devices, USA)로 450 nm에서 OD(Optical density)를 측정하였다. Standard Curve를 만들어 sample의 TNF- α 양을 assay하였다.

8) IL-1 β 측정

IL-1 β 측정은 Rat IL-1 β (Invitrogen, USA)를 사용하여 측정하였다. Rat IL-1 β 가 coating된 microplate에 Rat IL-1 β standard 100 μ l, serum, control 50 μ l에 Standard Diluent Buffer 50 μ l를 첨가하고 plate cover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 실온에 3시간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Rt

Biotinylated anti IL-1 β 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에 1시간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Streptavidin-HRP Working solution 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에 30분간 방치하였다. Washing solution 400 μ l로 4회 washing 후 Stabilized Chromogen 100 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온(dark상태) 30분간 방치하였다. Stop solution 100 μ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 Spectramax(M2, Molecular Devices, USA)로 450 nm에서 OD(Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 IL-1 β 양을 assay하였다.

9) 조직학적 검사

① 조직 제작

우측 슬관절을 적출하여 Bouin 용액에 24시간 이상 고정하였으며, 5% 질산(nitric acid) 용액에서 3일 동안 매일 질산액을 교환하면서 탈회(decalcification)를 실시하였다. 파라핀 블록의 제작을 위해 채취한 조직은 Tissue Processor(Tissue-TEX II, Japan)를 사용하여 조직탈수 과정을 거치게 하였다.

② Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

조직은 deparaffin을 거친 후 Hematoxylin(Muto, Japan)과 Eosin(Muto, Japan)으로 염색한 후 물로 세척하고 dehydration 과정을 거쳐 광학 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

③ Safranin O - fast green 염색

조직은 deparaffin을 거친 후 Hematoxylin(Muto, Japan)용액에 10분간 반응시킨 후 10분간 흐르는 물에 세척하였고, 0.001% Fast green(Sigma, USA)용액에 5분 동안 염색하고, 다시 1% 아세트산 용액에 10초간 반응시킨 후 0.1% Safranin O(Sigma, USA)용액에 5분간 염색하였다. 그 다음 10분간 충분히 세척하여 dehydration 과정을 거쳐 광학 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

3. 통계 분석

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS 14.0 ver. for windows를 사용하였다. 관절염 유발 후 용량별 투여에 따른 각 군간의 통계학적 분석은 One-Way ANOVA test를 시행하였고 사후검정은 LSD test로 분석하였으며, 족부중 변화에 대한 시점별 차이는 Repeated Measures ANOVA로 측정하였고 사후검정은 Bonferroni test로 분석하였다. 실험의 분석에서 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

결 과

1. 족부 육안 소견

CWS-A 투여가 육안적 소견에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군의 경우 CFA로 유발된 좌측 후지에 발적 및 종창이 관찰되었으며, CWS-A I 군과 CWS-A II 군에서 발적과 종창의 발현은 점차 줄어들었다(Fig. 1).



Fig. 1. Changes on the Gross lesion of hind paws after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats.

A : intact control.
 B : CFA control.
 C : CWS-A 82.3mg/kg treated group.
 D : CWS-A 164.6mg/kg treated group.

2. 족부종 및 족근관절 변화에 미치는 영향

1) 족부종 변화

족부종의 시점별 차이에 따른 반복측정분산분석 결과 집단간(p=0.004), 시점간(p<0.001), 집단과 시점간에 상호작용이 있었다(p<0.001). Bonferroni test 결과 유발전에 비해 유발 후 15일째(p=0.009)와 20일째(p<0.001)에 유의하게 감소함을 보였다.

CWS-A 투여가 족부종 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 유발전 1.60±0.04 ml, 유발후 10일째에 1.80±0.03 ml, 15일째에 1.54±0.04 ml, 20일째에 1.54±0.04 ml 을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군은 유발후 15일째(CWS-A I 투여후 5일째), 20일째(CWS-A I 투여후 10 일째) 유의하게 감소(p<0.01)하였고, CWS-A II 군에서도 유발 후 15일째(CWS-A II 투여후 5일째), 20일째(CWS-A II 투여후 10일째) 유의하게 감소(p<0.01)를 보였다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Changes on the Paw Edema Volume after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Groups	Days	0	10	15 (5 days) [§]	20 (10 days) [§]
Control					
Intact (n=10)		1.60±0.04	1.80±0.03	1.54±0.04	1.54±0.04
CFA (n=10)		1.51±0.03	2.48±0.07 ^{##}	2.54±0.08 ^{##}	3.06±0.14 ^{##}
CWS-A					
82.3mg/kg(n=11)		1.42±0.05	2.56±0.05	2.14±0.09 ^{**}	2.54±0.06 ^{**}
164.6mg/kg (n=11)		1.51±0.03	2.24±0.11	1.80±0.08 ^{**}	2.31±0.07 ^{**}

F-value : Group 6.86, Day 126.23, Group*Day 4.23
 P-value : Group 0.004, Day <0.001, Group*Day <0.001

Values are expressed Mean±SE ; CFA, Complete Freund's Adjuvant ; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A ; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively ; § 5days, 10 days after CWS-A administered ; ## P<0.01 compared with intact control ; ** P<0.01 compared with CFA control.

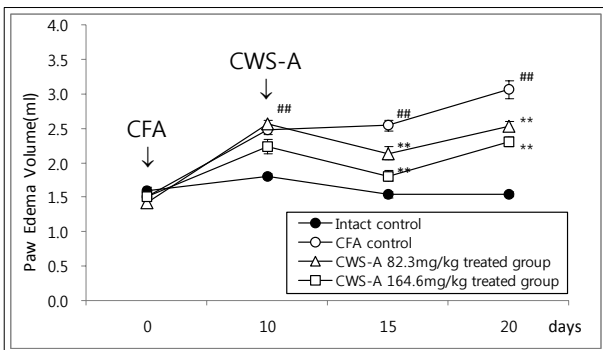


Fig. 2. Effect of CWS-A treatment on the Paw Edema Volume after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats. A description of controls and CWS-A groups refer to Table 2 ; ## P<0.01 compared with intact control ; ** P<0.01 compared with CFA control.

2) 족근관절 두께 변화

CWS-A 투여가 족근관절 두께 변화에 미치는 영향을 관찰

한 결과, 대조군은 7.68±0.20 mm, CWS-A I 군은 7.06±0.16 mm, CWS-A II 군은 7.18±0.28 mm을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의성은 인정되지 않았으나 감소의 경향을 보였다(Table 3).

Table 3. Changes on the Ankle Joint Thickness after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	Ankle Joint Thickness (mm)
Controls	
Intact (n=10)	5.20±0.06
CFA (n=10)	7.68±0.20 [#]
CWS-A	
82.3mg/kg (n=11)	7.06±0.16
164.6mg/kg (n=11)	7.18±0.28

F-value 2.222, P-value 0.127

Values are expressed Mean±SE ; CFA, Complete Freund's Adjuvant ; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A ; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively ; # P<0.05 compared with intact control.

3. Serum aminotransferase에 미치는 영향

1) Aspartate Aminotransferase (AST) 함량

CWS-A 투여가 AST 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 94.0 ± 4.4 U/l, CWS-A I 군은 85.2 ± 4.7 U/l, CWS-A II 군은 86.2 ± 4.5 U/l을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의성은 인정되지 않았으나 감소의 경향을 보였다(Table 4).

Table 4. Changes on the Aspartate Aminotransferase contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	Aspartate Aminotransferase (U/l)
Controls	
Intact (n=10)	67.0 ± 3.0
CFA (n=10)	$94.0 \pm 4.4^{##}$
CWS-A	
82.3mg/kg (n=11)	85.2 ± 4.7
164.6mg/kg (n=11)	86.2 ± 4.5
F-value 1.142, P-value 0.333	

Values are expressed Mean \pm SE; CFA, Complete Freund's Adjuvant; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively; ## P<0.01 compared with intact control.

2) Alanine Aminotransferase (ALT) 함량

CWS-A 투여가 ALT 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 42.1 ± 2.7 U/l, CWS-A I 군은 34.0 ± 2.0 U/l, CWS-A II 군은 34.9 ± 1.3 U/l을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의한 감소(p<0.05)를 보였다(Table 5).

Table 5. Changes on the Alanine Aminotransferase contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	Alanine Aminotransterase (U/l)
Controls	
Intact (n=10)	34.0 ± 1.7
CFA (n=10)	$42.1 \pm 2.7^{#}$
CWS-A	
82.3mg/kg (n=11)	$34.0 \pm 2.0^*$
164.6mg/kg (n=11)	$34.9 \pm 1.3^*$
F-value 4.590, P-value 0.185	

Values are expressed Mean \pm SE; CFA, Complete Freund's Adjuvant; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively; # P<0.05 compared with intact control; * P<0.05 compared with CFA control.

4. Anti-inflammatory factor에 미치는 영향

1) Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 함량

CWS-A 투여가 TNF- α 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 8.39 ± 5.19 pg/ml, CWS-A I 군은 $3.59 \pm$

0.55 pg/ml, CWS-A II 군은 3.17 ± 0.38 pg/ml을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의성은 인정되지 않았으나 감소된 경향을 보였다(Table 6).

Table 6. Changes on the Tumor Necrosis Factor- α contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	Tumor Necrosis Factor- α (pg/ml)
Controls	
Intact (n=10)	1.91 ± 0.31
CFA (n=10)	8.39 ± 5.19
CWS-A	
82.3mg/kg (n=11)	3.59 ± 0.55
164.6mg/kg (n=11)	3.17 ± 0.38
F-value 0.908, P-value 0.414	

Values are expressed Mean \pm SE; CFA, Complete Freund's Adjuvant; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively.

2) Interleukin-1 β (IL-1 β) 함량

CWS-A 투여가 IL-1 β 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 1.87 ± 0.44 pg/ml, CWS-A I 군은 1.80 ± 0.25 pg/ml, CWS-A II 군은 1.82 ± 0.31 pg/ml을 각각 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의한 차이는 나타나지 않았다(Table 7).

Table 7. Changes on the Interleukin-1 β contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	Interleukin-1 β (pg/ml)
Controls	
Intact (n=10)	1.30 ± 0.13
CFA (n=10)	1.87 ± 0.44
CWS-A	
82.3mg/kg (n=11)	1.80 ± 0.25
164.6mg/kg (n=11)	1.82 ± 0.31
F-value 0.908, P-value 0.414	

Values are expressed Mean \pm SE; CFA, Complete Freund's Adjuvant; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively.

5. 혈액 Complete Blood Count(CBC) 함량 변화에 미치는 영향

1) Leukocytes

CWS-A 투여가 혈액 CBC 중 Leukocytes 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 neutrophils에서 유의하게 증가된 상태를 나타내었고 (p<0.05), WBC, Monocytes에서는 유의하지는 않았으나 증가된 경향을 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 WBC, Leukocytes, Monocytes에서 유의성은 인정되지 않았으나 감소의 경향을 나타내었다(Table 8).

Table 8. Changes on the blood WBC, Neutrophils, Lymphocytes and Monocytes contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	WBC (K/uL)	Neutrophils (K/uL)	Lymphocytes (K/uL)	Monocytes (K/uL)
Controls				
Intact (n=10)	5,4±0,4	1,34±0,08	3,80±0,28	0,26±0,03
CFA (n=10)	5,9±0,6	1,85±0,23 [#]	3,70±0,45	0,33±0,03
CWS-A				
82,3mg/kg (n=11)	5,4±0,4	1,97±0,17	3,10±0,25	0,33±0,01
164,6mg/kg (n=11)	5,2±0,3	1,84±0,15	3,00±0,14	0,30±0,04
F-value	0,681	0,172	1,574	0,252
P-value	0,514	0,843	0,224	0,779

Values are expressed Mean±SE ; CFA, Complete Freund's Adjuvant ; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A ; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively ; # P<0.05 compared with intact control.

2) Erythrocytes와 Thrombocytes
 CWS-A 투여가 혈액 CBC 중 erythrocytes와 thrombocytes 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC에서 유의하게 감소된 상태를 나타냈고(p<0.01), PLT에서 유의하게 증

가된 상태를 나타내었다(p<0.01). 대조군에 비하여 CWS-A I 군은 유의성은 인정되지 않았으나 HCT, MCV, MCH, MCHC에서 증가의 경향을 나타내었다. 대조군에 비하여 CWS-A II 군은 HGB, HCT, MCH, MCHC에서 유의한 증가를 나타내었다(p<0,05, p<0,01))(Table 9).

Table 9. Changes on the blood RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC and PLT contents after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

Group	RBC (K/uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (K/uL)
Controls							
Intact (n=10)	7,9±0,1	15,0±0,2	51,8±0,6	65,6±0,5	19,0±0,2	29,0±0,2	852,8±30,5
CFA (n=10)	7,9±0,1	13,1±0,2 ^{##}	47,9±0,7 ^{##}	60,9±0,7 ^{##}	16,6±0,3 ^{##}	27,2±0,4 ^{##}	1,051,1±25,9 ^{##}
CWS-A							
82,3mg/kg (n=11)	7,9±0,2	12,8±0,8	49,0±1,0	61,9±0,8	17,1±0,3	27,7±0,2	1,162,0±50,0
164,6mg/kg (n=11)	8,1±0,1	14,5±0,2 [*]	50,5±0,6 [*]	62,6±0,8	18,0±0,4 ^{**}	28,7±0,4 ^{**}	986,0±34,5
F-value	0,520	3,135	2,510	1,260	4,832	4,199	5,403
P-value	0,600	0,059	0,099	0,299	0,015	0,025	0,010

Values are expressed Mean±SE ; CFA, Complete Freund's Adjuvant ; CWS-A, Gihyeolgwanjeolbang-A ; Two different dosages of CWS-A were orally administered in this study respectively ; ## P<0.01 compared with intact control ; * P<0.05, ** P<0.01 compared with CFA control.

6. 조직학적 소견

1) HE 염색

CWS-A 투여가 조직학적 소견에 미치는 영향을 HE 염색을 한 후 관찰한 결과, 정상군(Fig. 10A)은 관절연골, 관절주

머니, 윤활막세포가 관찰되었다. 대조군(Fig. 3B)에서는 윤활막의 일부분이 손상되어 있었으며, CWS-A I 군(Fig. 3C)과 CWS-A II 군(Fig. 3D)에서는 윤활막 세포, 연골소강, 연골세포는 정상군과 유사한 소견을 보여주었다.

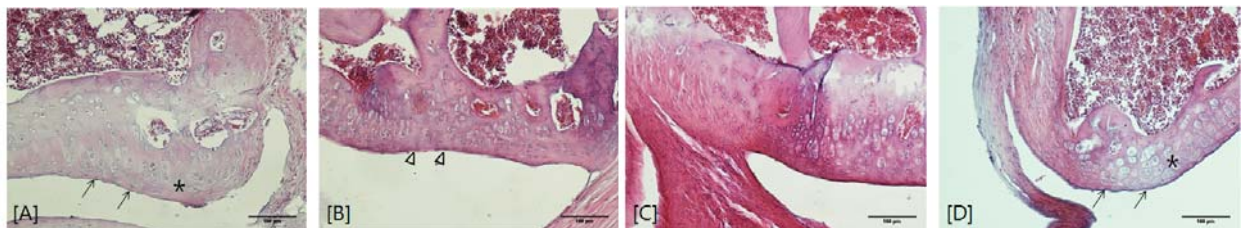


Fig. 3. Changes on the histopathological change (HE stain) of knee joint after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats.

A : intact control
 B : CFA control, arrow head(Δ) indicate destroyed synovial membrane
 C : CWS-A 82.3mg/kg treated group
 D : CWS-A 164.6mg/kg treated group
 Synovial membrane (arrow) and chondrocytes(*) in [A] and [D] were observed. HE-stain, Scale bars = 100µm

2) Safranin O-fast green 염색

CWS-A 투여가 조직학적 소견에 미치는 영향을 safranin O-fast green 염색으로 관찰한 결과, 정상군(Fig. 4A)에서는 뼈조직과 접하고 있는 속층의 관절연골에서 proteoglycans 양성반응이 높게 관찰되었다. 대조군(Fig. 4B)의 관절연골은

정상군에 비하여 proteoglycans 양성반응이 낮게 나타났다. CWS-A I 군(Fig. 4C)에서는 대조군과 비슷한 소견을 보여주었으나, CWS-A II 군(Fig. 4D)에서는 정상군에 비하여 미약하지만 뼈조직과 인접한 속층의 연골층에서 proteoglycans 양성반응이 다소 높게 관찰되었다.

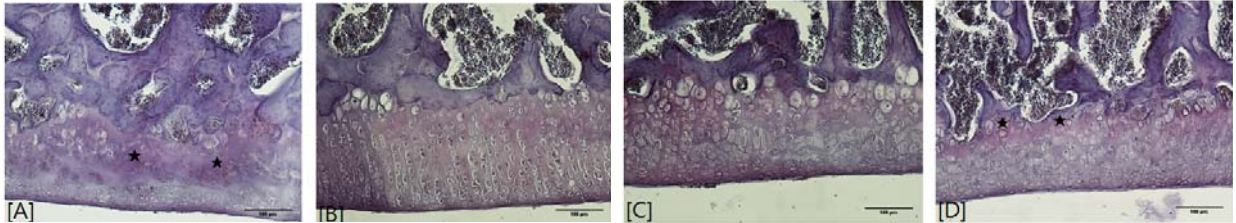


Fig. 4. Changes on the histopathological change (Safranin O-fast stain) of knee joint after CWS-A administrations in CFA induced arthritis rats

A : intact control

B : CFA control

C : CWS-A 82.3mg/kg treated group

D : CWS-A 164.6mg/kg treated group

Asterisk risk(★) in [A] and [D] indicate proteoglycans-positive area. Safranin O-fast green stain, Scale bars = 100µm

고 찰

류마티스 관절염은 교원성 질환의 일종으로 다발성으로 발생하며, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절 연골과 그 주위 조직을 파괴하여 관절 부종과 동통을 초래한다. 류마티스 관절염의 조직학적 소견은 미세혈관의 손상과 조직의 부종, 활막 세포의 증식과 혈관 주위의 림프구 침윤 등이 다¹³⁾.

염증성 사이토카인과 대식세포, CD4+ T 림프구 등이 류마티스 관절염의 면역 염증 질환 유발과 관절의 파괴에 있어서 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 침윤된 활액 조직내의 세포들은 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 등을 분비하며, 고착분자와 단백질 분해효소의 유전자 발현 등의 생성량을 증가시킨다¹⁶⁾. 이들 사이토카인의 국소적인 생산물이 류마티스 관절염의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 생각되며, 이러한 요소들이 다른 염증세포의 유인과 활성화 및 연골과 곡의 쇠퇴에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾.

류마티스 관절염은 한의학에서 痺證으로 인식되고 있으며, 痺證의 병인에 대하여 《黃帝內經素問·痺論》¹⁸⁾에서 “風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也”라고 처음으로 언급된 이래, 《金匱要略》¹⁹⁾에서는 “因疲勞汗出, 臥不時動搖, 加被微風, 遂得之”라 하고, 《景岳全書》²⁰⁾에서는 “眞陰衰弱, 精血虧損, 故三氣得以勝之而爲痺”라 하여 虛證에 속하는 內因에 風寒濕의 外因이 겹쳐서 발생한다고 했으며, 즉 痺證은 인체의 營衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱한 틈을 타고 風寒濕의 邪氣가 肌肉과 經絡으로 침입하거나 관절에 凝滯됨으로써 氣血運行이 순조롭게 되지 못하게 되는 것이 원인임을 알 수 있다²¹⁾.

痺證에 대하여 임상에서 대응되는 痺證方이 병태별로 《方藥合編》에 비교적 잘 정리되어 있는데, 그 중 大防風湯, 大羌活湯, 三氣飲, 獨活寄生湯, 疎風活血湯, 烏藥順氣散, 行濕流氣散, 蠲痺湯 등이 언급되어 있다²²⁾. 관절질환에 이러한 처방

이 활용되고 있는 바, CWS-A방은 이들 처방을 근거하여 창안한 처방으로 한의학적으로 強筋骨, 利水排膿, 清熱燥濕, 理氣止痛, 行氣血, 活血破瘀, 滋補肝腎 등의 효능을 가지고 있는 17가지 한약제제로 구성되어 있다. 본 처방의 구성 약물들의 효능을 살펴보면, 鹿茸은 壯元陽, 生精髓, 強筋骨하고, 다시마(昆布)는 消痰結, 散癭瘤하고, 薏苡仁은 利水滲濕, 除濕痺, 清肺排膿, 健脾止瀉하고, 黃柏은 清熱燥濕, 瀉火解毒하고, 玄胡索은 活血祛瘀, 理氣止痛하고, 三七根은 化瘀止血, 活血定痛하고, 丹蔘은 活血調經, 涼血消癰, 養血安神하고, 蓬朮은 行氣破血, 消積止痛하고, 杜冲은 補肝腎, 壯筋骨, 安胎하고, 牛膝은 活血祛瘀, 通利關節, 引血引火下行, 補肝腎, 強腰膝하고, 白芍藥은 養血斂陰, 平抑肝陽, 柔肝止痛하고, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血行瘀하고, 香附子是 理氣解鬱, 調經止痛하고, 薑黃은 破血行氣, 通經止痛하고, 當歸는 補血活血, 調經止痛, 潤腸通便하고, 黃芪는 補氣升陽, 固表止汗, 托毒排膿, 生肌, 利水退腫하고, 白芥子是 溫肺祛痰, 利氣散結, 通絡止痛하는 효능을 각각 가지고 있다^{23,24)}.

본 처방의 구성약물 중 연구 보고된 것으로는 녹용은 관절 윤활막내 염증반응 억제효과가 있음²⁵⁾, 의이인, 백작약, 향부자, 강황, 황기는 강한 항산화작용이 있음^{26~30)}, 현호색은 관절내 염증 억제작용이 있음³¹⁾, 당귀는 면역과 혈액성분을 활성화하는 효능이 있음^{32,33)} 각각 보고하였다.

위의 내용을 고려해 볼 때 CWS-A방은 관절질환에 유효한 약재의 배합으로 사료되며, 이에 본 처방의 관절질환 개선에 대한 유효성을 관찰하기 위하여 CFA로 유발된 흰쥐에게 CWS-A를 투여하여 족부중, 혈청 aminotransferase, anti-inflammatory factor, 혈액학적 및 조직학적 변화를 관찰하였다.

류마티스 관절염의 대표적인 소견 중 한 가지는 부종이다³⁾. 따라서 부종의 억제 정도에 따라 관절염 모델의 치료 효과를 판정할 수 있는데, 정상군에 비하여 대조군에서 CFA로 인한 발적과 종창이 관찰되었다는 점과 CWS-A I 군과

CWS-A II 군에서 시일에 따라 발적과 종창의 발현되는 정도가 감소하였다는 점을 고려해 본다면 CWS-A의 치료 효과로 사료된다.

족부종 자체의 변화와 족근관절의 변화를 조사해 보았는데, CFA 대조군은 족부종 유발 후 10일째, 15일째, 20일째에 전체적으로 증가하는 추세였던 것에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유발 후 15일째(CWS-A 투여 후 5일째)와 20일째(CWS-A 투여 후 10일째)에 유의한 감소를 나타냈으며, 족근관절의 두께 변화에 있어서도 CWS-A I 군과 CWS-A II 군이 감소의 경향을 나타내어 비슷한 결과를 나타내었다.

AST는 급만성 간염, 지방간, 폐색성 황달, 원발성 담즙성 간병변, 심근경색, 근육질환, 용혈성 질환에서 증가하는데³⁴⁾, 본 실험에서 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 정상군에 비해서는 높았고 대조군에 비해 유의성은 인정되지 않았으나 감소된 경향을 나타내었다. ALT는 AST에 비해 간에 특이적으로 간기능의 검사, 염증성 질환 치료 효과의 관찰, 독성약품에 의한 간장애의 평가 등에 이용되는데³⁵⁾, 대조군에 비해 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의한 감소를 보였을 뿐 아니라 정상군과 거의 비슷한 수치를 나타냈다.

TNF- α 는 대식세포에 의해 분비되는데 류마티즘 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고 호중구, 림프구, 단핵구의 화학유주 및 섬유모세포, 활막섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE₂와 collagenase 생산을 촉진한다³⁶⁾. 대조군에 비해 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의성은 인정되지 않았으나 감소된 경향을 나타내었으며, 이는 CWS-A가 관절의 연골세포 손상을 억제하는 경향이 있는 것으로 사료된다.

IL-1 β 는 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고 백혈구의 유주 및 섬유모세포의 증식을 촉진시키고 또한 활막섬유모세포와 연골세포에 작용하여 PGE₂와 collagenase 생산을 유도하고 osteoclast를 활성화시켜 관절 연골과 골의 파괴를 초래한다^{36,37)}. 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 이는 CWS-A가 염증을 억제하는 작용, 즉 淸熱작용은 크지 않은 것으로 사료된다.

혈중의 백혈구는 염증성 질환이나 감염성 질환, 그리고 조직괴사 등에서 증가하는데 호중구는 급성염증에서, 림프구 및 단핵구는 만성염증에서 증가 및 침윤한다³⁴⁾. 대조군은 neutrophils에서 유의하게 증가되었고 WBC, Monocytes에서는 유의하지는 않으나 증가된 경향을 나타내었는데 대조군에 비하면 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의성은 없었으나 전체적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 이의 결과도 IL-1 β 와 같이 염증을 억제하는 작용인 淸熱작용이 두드러지지 않는 것으로 사료된다.

RBC는 대부분의 HGB를 함유하며 류마티스 관절염과 같은 질환의 경우 만성적인 빈혈로 인해 RBC의 수와 HGB의 수치가 감소하게 된다³⁾. Hemoglobin은 O₂와 CO₂를 운반하면서 염증성 질환의 경우 빈혈 소견을 나타내어 만성염증 환자의 질환에 유용한데³⁵⁾, 일반적으로 류마티스 관절염에서는 혈액계통이 만성질환성 빈혈을 나타낸다³⁸⁾. MCV는 평균적혈구 용적을 나타내고 MCH는 한 개의 적혈구 속에 든 평균 HGB 수치를 나타내며, MCHC는 한 개의 적혈구 속에 든 HGB의 농도를 나타내는데 이 값 모두가 감소할 경우 빈혈을 나타내게 된다³⁴⁾. 대조군의 경우 HGB, HCT, MCV, MCH,

MCHC에서 정상군에 비하여 유의하게 감소된 상태를 나타내었고, CWS-A II 군은 대조군에 비하여 HGB, HCT, MCHC에서 유의한 증가를 나타내었다. 이는 CWS-A가 CFA관절염에 대하여 活血, 滋補肝腎의 작용, 즉 erythrocytes계를 활성화시키는 작용이 발휘된 것으로 사료된다.

조직학적 소견은 류마티스 관절염이 관절의 손상 및 변형을 나타낸다는 점에서 매우 중요한 시사점을 나타낸다. HE염색의 경우 정상군에서 나타나는 관절연골, 관절주머니, 윤활막세포가 대조군과 CWS-A I 군에서는 윤활막세포가 거의 관찰되지 않았으나, CWS-A II 군에서는 윤활막세포가 일부 발견되었고, 연골소강과 연골세포는 정상군(Intact control)과 유사한 소견을 나타내었다. Safranin O-fast green염색을 적용했을 때, 정상군의 관절연골에서는 뼈조직과 접하고 있는 속층의 관절연골에서 proteoglycan이 집중적으로 관찰되었고 대조군(CFA control)과 CWS-A I 군에서는 반응이 낮게 나타났으나, CWS-A II 군에서는 정상군에 비하면 미약하지만 뼈조직과 인접한 속층의 연골층에서 proteoglycans이 관찰되어 조직이 재생되고 있는 소견을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 CWS-A 처방은 CFA로 유발된 관절염을 유의하게 개선할 수 있는 것으로 나타났으며, 이의 작용은 活血, 滋補肝腎 등의 작용에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 향후 임상연구 결과의 뒷받침이 있다면 관절염에 유용한 치료처방으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

관절질환 개선 약제로 구성된 한약배합제제 CWS-A의 유효성을 관찰하기 위하여 CFA로 유발된 흰쥐에게 용량별로 투여하여 족부종, 혈청 aminotransferase, anti-inflammatory factor, 혈액학적 및 조직학적 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 좌측후지의 발적 및 종창에 있어서 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 감소된 상태를 나타내었다.
2. 족부종 변화에 있어서 대조군에 비하여 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 15일째, 20일째에 유의한 감소를 나타내었다.
3. 혈청 aminotransferase 변화에 있어서 대조군에 비하여 ALT의 경우 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 유의한 감소를 나타내었다.
4. Anti-inflammatory factor 변화에 있어서 대조군에 비하여 TNF- α 의 경우 CWS-A I 군과 CWS-A II 군은 감소의 경향을 나타내었다.
5. 혈액학적 변화에 있어서 대조군에 비하여 CWS-A II 군은 HGB, HCT, MCH, MCHC에서 유의한 증가를 나타내었다.

6. 조직학적 관찰에서 CWS-A II 군은 윤활막세포가 관찰되었고, 연소강과 연골세포가 정상군과 비슷한 소견을 보였으며, 속층의 연골층에서 proteoglycans이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 CWS-A 처방은 CFA로 유발된 관절염을 유의하게 개선할 수 있는 것으로 나타났고, 본 연구결과에 기초하여 향후 임상연구 결과가 뒷받침된다면 관절염 치료에 유용한 제제로 사용할 수 있는 근거를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Naver dictionary. <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=487442>
2. Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. Seoul : Newest Medicine Company, 2001 : 123~31, 175~89.
3. Compilation Committee for Translation Harrison. Harrison's principles of international medicine. Seoul : Jeongdam company, 2006 : 78~99.
4. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine. Oriental Rehabilitation Medicine. Seoul : Kooja company, 2005 : 97~9.
5. Yonghun Choi. An Analysis of the Study Tendency on Rheumatoid Arthritis and its Treatment. Daejeon University Graduate school, 2009.
6. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant. Proceedings of the society for experimental biology and medicine, 1956 ; 91(1) : 95~101.
7. Byungchan Bae. Suppress Effects of Imyosan on Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritic Rats. DaeguHaany University Graduate School, 2011.
8. Sunmo Yun. Suppress Effects of So-Whal-Rack-Dan on Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritic Rats. DaeguHaany University Graduate School, 2010.
9. Dukhee Kim. Inhibiting Effects of Hwallak-dan on the Adjuvant-Induced Arthritis in Lewis Rats. Semyung University Graduate School, 2009.
10. Byungsun Je. (The) study on the effects of Dang-gui-cheon-gung-tang-ka-mi-bang on the arthritis. Daejeon University Graduate School, 2005.
11. Duksoon Hwang. Effects of Kagammokbanggi-Tang on the Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. Semyung University Graduate School, 2005.
12. Jaek Sul. Experimental effects of Mahwangkanghwal-Tang on the adjuvant arthritis in rats. Dongshin University Graduate School, 2005.
13. James B Wyngedden. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia. WA Sauders company, 1992 : 1508~15.
14. Brahn E, Peacock DJ, Banquerigo ML, Liu DY. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on collagen arthritis. Lymphokine Cytokine Res, 1992 ; 11(5) : 253~6.
15. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 1996 ; 39(12) : 1961~9.
16. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis : what have we learned? Annu Rev Immunol, 2001 ; 19 : 163~96.
17. Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. J Immunol, 2002 ; 169(8) : 4332~9.
18. Yugyul Yang. Huangjenaegyeongsomunseokhae(黃帝內經素問釋解). Seoul : Iljung Company, 1991 : 328.
19. Jungkyung Jang. Jingguiyaolue(金匱要略). Taiwan : Daeryungulpung Company, 1973 : 32~3.
20. Gaebin Jang. Complete Works of Zhang Jingyue(景岳全書). Seoul : Hanglimseowon, 1975 : 153~9.
21. Jesik Kwon. Bi-syndrome(痺證). Seoul : Jeongdam company, 1993 : 23~9.
22. Jungheui Lee, Taewon Song, Minseok Oh. Analysis of the herb medications corresponded with Bi-jeung of Bangyakhappyeon. J Institute of Oriental Medicine of Daejeon University, 2001 : 10(1) : 375~83.
23. Mingyu Shin. Clinical Herbal-Medicine. Seoul : Younglim Company, 2006 : 194~6, 209~10, 204~5, 236~9, 240~2, 385~7, 405~7, 477~8, 479~80, 497~8, 517~8, 519~21, 525~7, 654~7, 731~2, 736~7.
24. Deogyun An et al. The Encyclopedia of Chinese Medicine. Seoul : Jeongdam company, 1998 : 141~7, 393~7, 1036~43, 1117~26, 1159~68, 1451~5, 2020~2, 2179~83, 2769~75, 4177~86, 4418~25, 6124~30, 6460~71, 6512~25.
25. YongRe Chung, SeungDeok Lee, Hyuk Byun, InShik Park, ChanYung Jung, ChangHwan Lee, KapSung Kim. The Effect of Deer Antler Herbal Acupuncture Control to Hyper-inflammatory Responses on Synovial Membrane by LPS-induced Arthritis. J Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2007 ; 24(4) : 167~81.
26. YongKi Park, ByungSoo Kang. Studies on the Effects of Coicis Semen and Sophorae Radix on

- the Antioxidation, *Kor J Herbology*, 2000 ; 15(2) : 57~67.
27. Ill-Yun Jeong, Joo-Sang Lee, Heon Oh, Uhee Jung, Hae-Ran Park, Sung-Kee Jo. Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Paeonia japonica* on Oxidative Stress and Identification of Its Active Components, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2003 ; 32(5) : 739~44.
 28. EunYoung Hwang, DongHee Kim, HuiJeong Kim, JoYoung Hwang, TaeSoon Park , InSun Lee, Jun Ho Son. Antioxidant Activities and Nitric Oxide Production of Medicine Plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*), *Journal of Applied Biological Chemistry*, 2011 ; 54(3) : 171~7.
 29. HyunJin Kim, JungWon Lee, YongDoo Kim. Antimicrobial Activity and Antioxidant Effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*, *Korean J Food Preservation*, 2011 ; 18(2) : 219~25.
 30. JongCheng Mou, SeNa Lee, MyungGyou Kim, MyoungHee Kim, HyungJun Kim, HakJun Jo, KangHyun Leem. Effects of *Astragali Radix* Extracts on the Elastase Activity and DPPH and NO Scavenging Activities, *Kor J Herbology*, 2011 ; 26(1) : 59~63.
 31. ByeongSu Kim, YeonSeob Kim, Effect of *Corydalis Tuber*, *Paeoniae Radix Rubra*, *Carthami Flos* Complex Herbal Acupuncture on Inflammation and Liver in Rats with Arthritis induced by Freund's Complete Adjuvant, *Kor J Herbology*, 2004 ; 19(1) : 95~102.
 32. JungHwa Kim, DaeHo Kim, JinHyun You, CheolHee Kim, MinChul Kwon, NakSul Seong, SeungEun Lee, HyeonYong Lee. Immuno-regulatory Activities of Various Fractions from *Ehpedrae Sinica* STAPP, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai Extracts, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 2005 ; 13(4) : 161~170.
 33. Suna Kang, Gihyo Jang, Jieun Lee, Deogyun An, Seonggyu Park. Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats, *Korean J Food Sci Technol*, 2003 ; 35(6) : 1204~8.
 34. Kuinyung Lee, Jongsun Lee. Clinical pathology files, Seoul : Medical culture Company, 1990 : 82~7, 740~1.
 35. Kuinyung Lee, Haeran Moon, Eunhee Lee. Lab Test 2000 Directory, Seoul : Korea Medicine Company, 1998 : 71~4.
 36. Yaron I, Meyer FA, Dayer JM, Yarom M, Human recombinant interleukin-1 beta stimulates glycosaminoglycan production in human synovial fibroblast cultures, *Arthritis and rheumatism*, 1987 ; 30(4) : 424~30.
 37. Tehyun Yoon, Sangkeun Oh. A Histopathological Study on the Rheumatoid Arthritis of the Knee Joint, *J Korean Orthop Assoc*, 1981 ; 16(3) : 528~38.
 38. Lee Moonho et al. Internal Medicine, Seoul : Haklim Company, 1986 : 1693~727.