

류마티스 관절염에서 광금전초 추출물의 관절염 억제 효과

노은미¹ · 송현경¹ · 김정미¹ · 이금산² · 권강범^{1,3*} · 이영래^{1,4*}

1 : 원광대학교 의과대학 대사질환연구센터, 2 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실,
3 : 원광대학교 한의과대학 한방생리학교실, 4 : 원광대학교 치과대학 생화학교실

Extracts of Desmodii Herba Suppresses of Rheumatoid Arthritis

Eun Mi Noh¹, Hyun Kyung Song¹, Jeong Mi Kim¹, Guem San Lee², Kang Beom Kwon^{1,3*}, Young Rae Lee^{1,4*}

1 : Center for Metabolic Function Regulation, Wonkwang University School of Medicine,

2 : Department of Herbology, School of Korean Medicine,

3 : Department of Korean Physiology, Wonkwang University School of Korean Medicine,

4 : Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterials, Implant, School of Dentistry, Wonkwang University

Desmodii Herba (DH) has been shown to exhibit pharmacological activities, such as increase myocardial contraction and secretion of hepatic bile. DH is used to reduce pain caused by rheumatoid arthritis(RA) in Korean medicine. However, the DH exact(DHE) effect and mechanism on rheumatoid arthritis are unknown. In this study, we aimed at the inhibitory effect of DHE on rheumatoid arthritis, and investigated the effect in collagen-induced mice arthritis model and TNF- α -induced MMP-1 and MMP-3 expression including the molecular basis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASFs). The effect of DHE on RA was measured by clinical scoring system. In RASFs, expression of MMP-1 and MMP-3 was assessed by Western blotting and real-time PCR. Also, Western blotting used to evaluate the phosphorylation levels of p38, ERK and JNK and activation of NF- κ B and AP-1. Our results showed that DHE reduced collagen-induced arthritis in mice. DHE inhibits TNF- α -induced MMP-1 and MMP-3 expression and mRNA levels in RASFs. The inhibitory effect of DHE was mediated by the inhibition of the AP-1/JNK signaling pathway. Taken together, our results suggest that the DHE may have preventive potential for rheumatoid arthritis.

keywords : Desmodii Herba(廣金錢草), Rheumatoid arthritis, MMPs, AP-1

서 론

류마티스 관절염은 대표적인 전신적 자가면역 질환으로 활막염증의 지속으로 인한 관절의 파괴와 변형을 특징으로 가지며^{1,2)}, 관절 외 증상으로는 심막염, 류마티스 결절, 폐 섬유화 등을 초래할 수 있다고 알려져 있다^{3,4)}. 또한, 류마티스 관절염은 치료와 관리에 오랜 기간을 필요로 하는 질환이기 때문에 장기간의 약물 투여에 따른 약물에 대한 내성과 부작용의 위험성에 노출되어 있다. 생약제제는 양약제제의 각종 부작용의 위험이 적다는 측면에서 많은 관심을 받고 있다⁵⁻⁷⁾.

관절연골의 붕괴는 matrix metalloprotease (MMP; 기질붕괴단백질)활성이 주요 원인으로 작용하는데, 기질붕괴단백질 중 MMP-1과 MMP-3는 활막 섬유아세포에서 분비되는 중요효소로 알

려져 있다^{8,9)}. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , IL-1 β 같은 사이토카인들이 관절 활막 세포를 자극하면 자극된 세포는 Nuclear Factor (NF)- κ B 와 Activator protein (AP)-1 전사인자 활성이 유도되어 기질붕괴단백질인 MMP-1과 MMP-3를 분비하게 되고, 분비된 기질붕괴단백질에 의해 연골이 분해됨으로써 관절염이 유도된다고 알려져 있다^{10,11)}.

광금전초(Desmodium styracifolium Merr.)는 금전초의 잎과 가지를 말하며, 주산지는 광동(중국)으로 알려져 있다. 광금전초의 효능으로는 심혈관에 작용하여 심근의 수축력을 증가시키고, 간담즙의 분비를 증가시키는 것으로 보고되어 있다¹²⁾. 또한 저자의 이전 연구에서 유방암 세포의 전이를 억제시키는 효능에 있어 광금전초가 NF- κ B 억제를 통하여 MMP-9의 발현을 억제 한다는 보고를 하였다¹³⁾. 그러나 류마티스 관절염에서 광금전초의 효능과 기전은

* Corresponding author

Kang-Beom Kwon, Department of Korean Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

E-mail : dession@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6917

Young-Rae Lee, Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterials, Implant, School of Dentistry, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro,

Iksan, Jeonbuk, Korea

E-mail : mindyr@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6917

Received : 2017/07/17 Revised : 2017/09/13 Accepted : 2017/11/15

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.328>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

보고되어 있지 않다. 따라서 광금전초 추출물이 류마티스 관절염에 중요한 MMP발현에 효과가 있을 것으로 사료되어 in vitro 실험에서 관절염 세포를 이용하여 MMP발현 억제를 확인하였다. 그리고 collagen으로 유발된 마우스 관절염모델에서도 MMP 조절 효과와 관절염 억제 효과를 확인하고, 이와 관련된 기전을 조사하여 유의성 있는 결과를 도출하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 재료

류마티스 관절염 환자에서 분리한 활막 세포 (Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts; RASFs)는 CELL APPLICATIONS 회사에서 구입하여 사용하였으며, DMEM 배지에 10% 소배아 혈청과 1% 항생제를 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO₂가 든 incubator에서 배양하였다. TNF- α , MMP-1 antibody, MMP-3 antibody는 R&D Systems (R&D systems, Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), β -actin antibody는 SIAMA에서 구입하였다. 항체 p-c-Jun, p-p38, p-ERK, p-JNK, p38, ERK 그리고 JNK는 cell signaling에서 구입하였다(Beverly, MA, USA). 항체 proliferating cell nuclear antigen(PCNA), p65, p50, 그리고 I κ B α 및 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. High glucose-containing DMEM, 소배아혈청, 항생제, trypsin 그리고 phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco-BRL (Gaithersburg, ME, USA)에서 구입하였다.

2. 광금전초 추출물의 분리

광금전초는 광명당(울산, 대한민국)에서 구입하였으며 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 진품 여부를 검증 받았고, 추출물은 아래와 같이 분리하였다. 광금전초 100 g을 70% 에탄올에 2시간 동안 노출시킨 후 무형광 솜을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45°C에서 Rotary Evaporator(N-1000SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하여 12.1 g을 획득하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다

3. Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석

RASFs에 광금전초 추출물을 1시간 동안 전처리 후에 TNF- α 를 처리하고 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포내 단백질 분리는 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 단백질 (20 μ g)은 전기영동을 시행하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 단백질을 이동하였다. 각각의 membrane은 5% bovine serum albumin 또는 5% skim milk를 사용하여 2시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체는 1 μ g/ μ l를 사용하여 4°C 냉장고에서 18시간 처리하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG (1:2000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현량은 image analyzer (Uvitex, Cambridge, UK)를 사용하여 확인하였다.

4. 실시간 역전사 효소 중합반응 (Quantitative real-time polymerase chain reaction - Real time RT-PCR)

MMP-1과 MMP-3의 유전자 발현 양을 비교하기 위해 세포에서 RNA를 Trizol Reagent (Life Technology, USA)을 이용하여 추출하였고, 1 μ g RNA는 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. MMP-1과 MMP-3 유전자 발현량은 StepOnePlus system과 SYBR Green (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 Real time RT-PCR을 수행하였고, housekeeping gene (GAPDH)과 비교하여 정량화하였다.

MMP-1 (NM 002424.2) primer: sense, 5'-AGTGACTGGAAACCGATGCTGA-3' and antisense, 5'-CTCTTGGCAAATCTGGCCTGT AA-3'; MMP-3 (NM 002422) primer: sense, 5'-ATTCCATGGA GCCAGGCTTTC-3' and anti sense, 5'-CATTGGGTCAAACCTCCAACCTGTG-3' and GAPDH (NM 002046) primer: sense, 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3' and anti sense, 5'-CGCCCCACTTGATT TTGG-3'

5. 핵산 추출 (Preparation of nuclear extract)

RASF에 광금전초 추출물을 1시간전처리 후 TNF- α 를 3시간 동안 처리하였다. 차가운 PBS로 세척 후, cytoplasmic과 nuclear 분리는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, USA)를 사용하였다.

6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용한 AP-1의 활성화 측정

AP-1의 유전자 결합 능력 확인을 위해 AP-1 consensus binding site를 가진 biotin이 붙은 oligonucleotide probe (5'-CCGGTTAA CAGAGGGGCTTCCGAG-3') oligo를 사용하였으며, 세포에서 분리한 핵 단백질은 2.5% (v/v) glycerol, 5 mM MgCl₂, 50ng/ μ l poly(di-dC), and 0.05% (v/v) NonidetP-40, 400 fmol oligo와 binding buffer를 섞어 상온에서 20분간 반응시킨 후 4% polyacrylamide gel에 걸쳐 전기영동을 한 후, 0.45 μ m nylon membranes (Hybond-N+; Amersham, Bucks, UK)에 전기 이동 시킨 후 crosslinker (CL-1000 ultraviolet crosslinker; UVP Inc, Upland, USA)를 사용하여 고정시켰다. membrane은 화학발광 핵산 확인 제품 (Thermo Scientific, Rockford, USA)과 image analyzer(Uvitex, Cambridge, UK)를 사용하여 이미지를 얻었다.

7. Collagen induced arthritis의 제작 및 광금전초 추출물 투여

6주령의 수컷 DBA/1 마우스를 구입하여 (Orient, Seoul, Korea) 1주일 동안의 안정화 기간을 거친 후 CIA를 유도하였다. 150ug 제2형 콜라겐 (Chondrex, Redmond, USA)과 300ug의 complete Freund adjuvant (CFA)를 균질기를 이용하여 1:1로 섞은 후 마우스 꼬리 기저부 1cm에 피내 주사하였다. 3주 후 생리식염수에 희석된 같은 양의 콜라겐을 복강에 투여하고, 1주일 뒤 5ug LPS (Chondrex, Redmond, USA)를 복강 투여하여 CIA를

유발시켰다. CIA에서 광금전초 추출물의 영향을 알아보기 위해 각 실험군은 7마리로 하였고, 광금전초 추출물 (250mg/kg)을 CIA유도 첫날부터 28일 동안 매일 경구투여 하였다.

8. 관절염의 평가

관절염의 발생 유무와 정도는 쥐의 사지에서 부종 및 발적의 유무로 평가하였고, 발등의 두께는 electrical caliper를 사용하여 측정을 하였다. 평가는 실험군과 대조군을 알지 못하는 관찰자가 하였다. 3주부터 주 2회 관찰하여 시기별로 중증도를 평가하여 점수화 하였다¹⁴⁾. 중증도 평가는, 중증도 0은 부종이나 종창이 없는 경우, 중증도 1은 경도의부종과 발적, 중증도 2는 발목 관절에서 발관절에 걸친 뚜렷한 부종과 발적, 중증도 3은 발목 에서 발가락에 걸친 뚜렷한 부종과 발적, 중증도 4는 발목에서 발가락에 걸친 흥반 및 심한 붓기로 분류하여 평가하였다.

9. 통계처리

실험 결과는 mean ± S.E.M으로 표시하였으며, 유의성의 검정은 One-Way anova test (Microcal Origin: version6.0: Microsoft: USA)를 사용하였다. 그리고 p < 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 광금전초 추출물의 TNF-α 유도 MMP-1과 MMP-3 발현에 대한 효과

류마티스 관절염에서 MMPs의 분비는 하나의 표지자로 작용하며, 여러 가지 MMP들중 MMP-1과 MMP-3는 활막 세포에서 만들어지며, 류마티스 관절염 환자의 활액에 매우 높은 양으로 존재한다고 알려졌다^{8,15,16)}. 따라서, RASFs에서 실험적으로 염증성 반응을 유도하기 위하여 TNF-α 처리한 후 MMP-1과 MMP-3 발현 증가에 대한 광금전초 추출물의 효과를 확인하였다. TNF-α 처리에 의해 증가된 MMP-1과 MMP-3는 광금전초 처리에 의해 유의적으로 억제되었다(Fig. 1A). 또한 Real time PCR 방법을 이용하여 mRNA 발현을 조사한 결과 광금전초 추출물이 TNF-α에 의해 증가하는 MMP-1과 MMP-3의 mRNA 발현이 유의성 있게 억제함을 확인하였다(Fig. 1B).

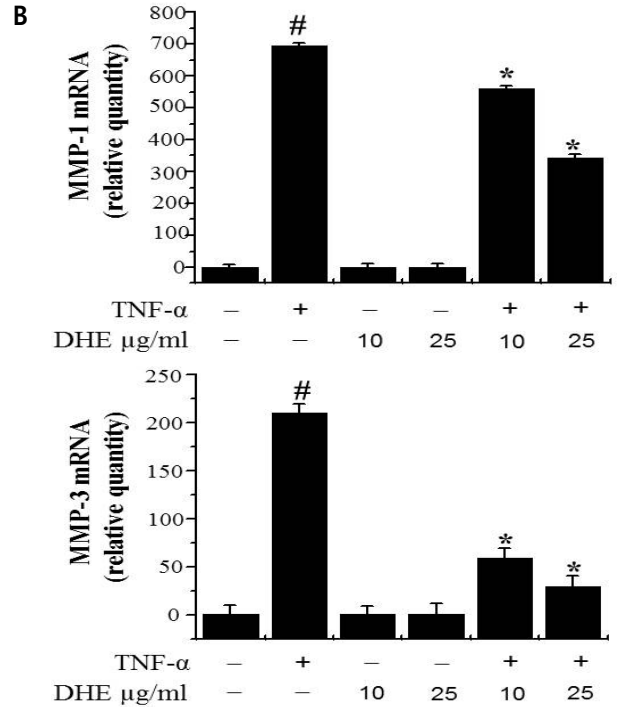
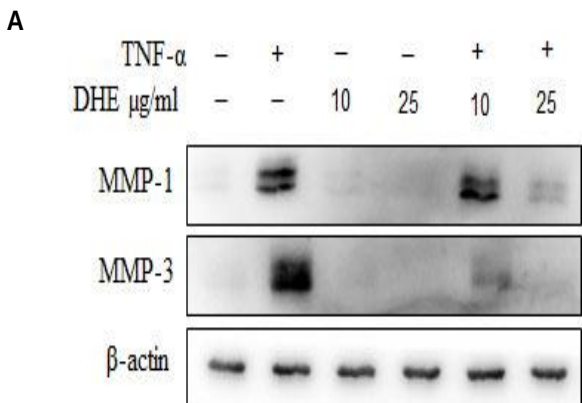


Fig. 1. Inhibition of TNF-α-induced expression of MMP-1 and MMP-3 in RASFs. RASFs were pre-treated with DHE for 1 h and stimulated with 10 ng/ml TNF-α for 24 h. (A) Total cellular protein was analysed by western blotting with anti-MMP-1 and anti-MMP-3 and anti-β-actin was used for confirm equal loading. (B)The MMP-1 and MMP-3 mRNA levels were measured using real-time qPCR method. Each value represents the mean ± the S.M.E of three independent experiments. #P<0.05 vs untreated control; *P<0.05 vs TNF-α

2. 광금전초 추출물의 TNF-α 자극에 따른 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/AP-1 신호 경로 활성화에 대한 효과

TNF-α 자극에 따른 MMPs 발현에 중요한 역할을 하는 전사 인자로 알려진 NF-κB와 AP-1은 MPAK family에 의해 활성화된다고 알려져 있다¹⁰⁾. MAPK는 p38, ERK와 JNK로 구성되어 있으며, 활성을 가진 인산화 형태가 운반조직에서 검출된다고 알려져 있다¹⁷⁾. 따라서, 광금전초 추출물의 MAPK 억제 효과를 확인하기 위하여, western blot 방법을 이용하여 MAPK 활성을 측정하였다. 그림 2A에서 보는 것과 같이 TNF-α는 MAPK 구성원인 p38, ERK, JNK의 인산화를 매우 효과적으로 증가시키며, 광금전초 전 처리는 이러한 인산화를 억제하였다. 광금전초 추출물의 MMP-1과 MMP-3 억제 효과의 세포 내 기전을 더 명확하게 규명 위하여 전사인자 활성화에 대한 영향을 western blot, EMSA 방법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 TNF-α 처리에 의해 NF-κB의 구성 인자인 p65와 p50의 핵으로의 이동 증가, NF-κB 조절 매개체인 IκBα의 붕괴증가, AP-1의 구성 인자인 c-Jun의 인산화가 증가하였고, 광금전초 추출물을 전 처리하였을 때 NF-κB 활성은 억제하지 않았으며, 오직 c-Jun의 인산화만 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 또한, 전사인자의 활성을 EMSA 방법을 사용하여 확인 한 결과 광금전초 추출물이 AP-1의 DNA 결합 능력 또한 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2C). 이러한 결과는 광금전초 추출물이 특이적으로 TNF-α 자극에 의한 신호 기전에서 AP-1 활성을 억제함을 나타낸다.

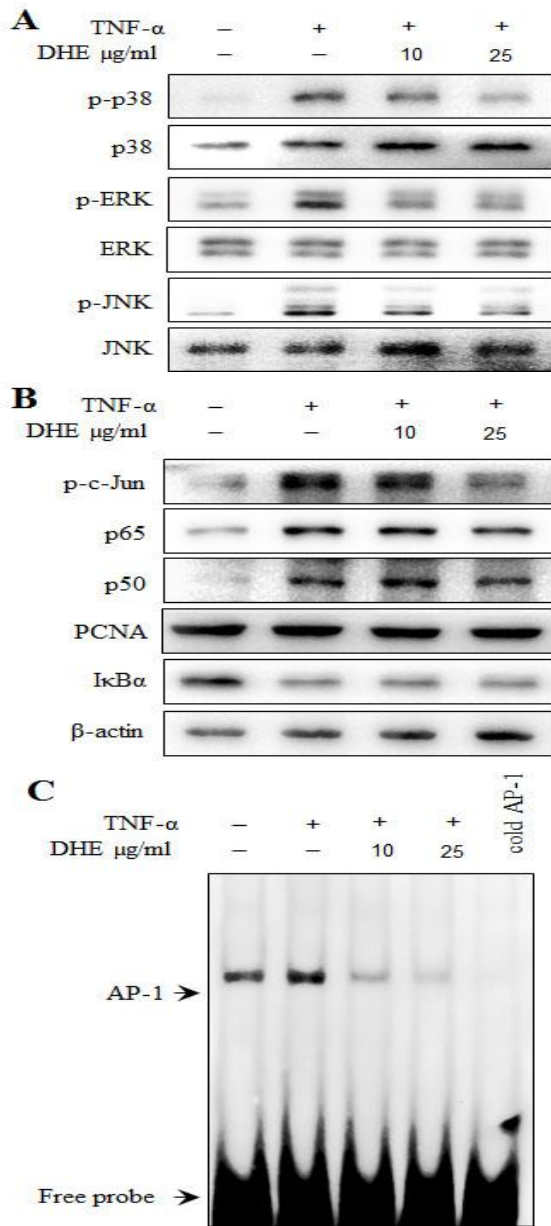


Fig. 2. DHE inhibits TNF- α -induced MAPKinase and AP-1 activation in RASFs. (A) Cells were pre-treated with DHE 1 h and treated with TNF- α 30 min. The cell lysates were analysed by western blotting with indicated antibodies. (B) RASFs were pretreated with DHE for 1 h, and then TNF- α was added. Expressions of p-c-Jun, p65 and p50 in nucleus and I κ B α in cytoplasm were determined by western blotting. (C) DNA binding of AP-1 was analyzed by electrophoretic mobility shift analysis.

3. 광금전초 추출물의 콜라겐 유도 마우스 류마티스 관절염 모델에 대한 효과

광금전초 추출물이 관절염의 발생을 억제하는지를 평가하기 위해, CIA 마우스 모델을 이용하였다. 광금전초 추출물을 PBS에 250 mg/kg으로 녹여 관절염 유도 1일째부터 28일 동안 경구투여 한 결과 대조군에 비해서 관절염의 지수가 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 3A,B and D). 발 두께 (Hind paw thickness)도 40%이상 통계적으로 유의하게 억제 되었다(Fig. 3C). 각 그룹간의 유의성 있는 몸무게 변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

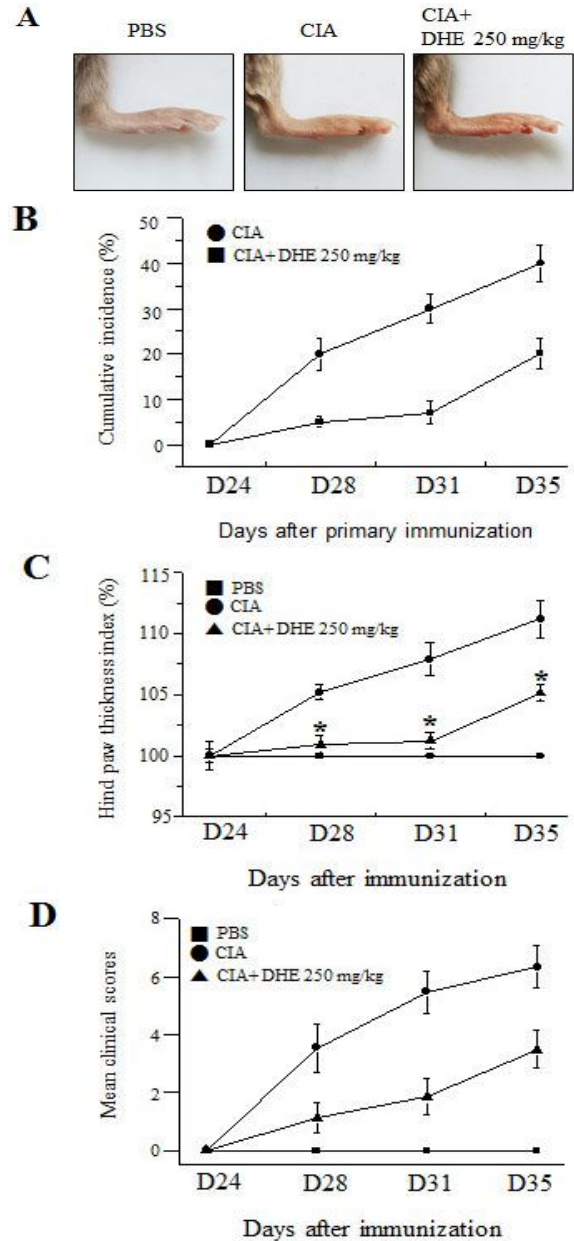


Fig. 3. Prevention of collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1 mice treated with DHE. CIA was induced as described in the Materials and methods section. (A) Photographs of the hind paws of CIA mice on day 35. (B) The cumulative incidence of arthritis, (C) the hind paw thicknesses (D) the clinical scores were determined on the indicated days. The Data values are the mean and SEM of 3 independent experiments (n= 7 mice per group). *P<0.05 vs CIA.

고 찰

류마티스 관절염은 대표적인 자가 면역 질환으로 치료시기를 놓치거나, 치료받지 않는 경우 관절 파괴로 인한 영구적인 장애발생을 초래할 수 있다¹⁸⁾. 류마티스 관절염에 대한 많은 연구로 치료에 진전이 있었으나 높은 약제비, 다양한 약물의 부작용등의 어려움이 여전히 존재 하고 있다^{6,7)}. 그럼에도 불구하고 많은 류마티스 관절염 환자들이 보조식품이나 대체 의학들을 이용하고 있어, 이들에 대한 검증 규명 연구의 중요성이 강조되고 있다^{19,20)}.

광금전초(*Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.)는 본초학에 의하면 황달을 치료하고, 방광결석을 용해시키며, 종기와 습진을 완화시킨다고 알려져 있다²¹⁾. 민간요법으로 류마티스 관절염 통증감소에 사용하여왔으나, 직접적인 효과에 대한 연구는 아직까지 수행되지 않았다. 이에 본 연구에서는 광금전초의 류마티스 관절염 예방 효능에 대한 검증을 위해 광금전초 추출물의 류마티스 관절 세포와 동물 모델을 이용하여 억제효과 및 기전 연구를 시행하였다.

광금전초 추출물은 콜라겐 유도 마우스 류마티스 동물 모델에서 관절염 유발 억제 효과를 보여주었다(Fig. 3). 이러한 관절염 유발 억제 효과가 어떤 세포학적 기전 조절에 의해 나타나는지 알아보기 위해, 우선 류마티스 관절염 유발에 있어 가장 중요한 단백질인 MMPs 발현에 대한 효과를 확인하였다. RASFs에서 TNF- α 에 의한 MMP 발현을 관찰한 결과 TNF- α 에 의해 유도되는 MMP-1과 MMP-3의 발현을 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 1). 이러한 결과는 광금전초의 류마티스 관절염 예방 및 치료효과가 있음을 시사한다.

MAPK 신호경로는 세포성장, 사멸, 사이토카인 발현과 MMP 생성 조절에 관련되어 있다고 알려져 있다. 활성화된 MAPK 형태는 활막 조직과 배양 류마티스 관절염 활막세포에서 검출된다고 보고되어 있으며, MAPK 억제제가 관절염에 효과가 있다는 보고와 같이 류마티스 관절염 중요 신호경로 단백질로 알려져 있다²²⁻²⁴⁾. 본 연구에서 광금전초 추출물은 p38, ERK, JNK 세 가지 MAPK 활성을 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 2). 이 결과는 광금전초가 MAPK 활성을 억제한다는 최초의 보고로 그 의미가 크다고 할 수 있다.

NF- κ B와 AP-1은 류마티스 발병학 측면에서 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있으며, MMPs 발현에도 중요한 전사인자로 알려져 있다. 또한 다양한 사이토카인들은 류마티스 관절염에서 AP-1과 NF- κ B 활성을 유도한다고 보고되어 있다²⁵⁻²⁷⁾. 따라서 본 연구에서 이러한 전사인자 활성을 확인한 결과 광금전초 추출물은 NF- κ B 활성을 억제하지 않았으며, 오직 c-Jun의 인산화만 억제에 의한 AP-1의 활성을 억제시키는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 광금전초는 류마티스 관절에서 NF- κ B 가 아닌, AP-1 활성 억제에 의해 MMP-1과 MMP-3 발현을 억제함으로써 류마티스 관절염의 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

향후 본 연구를 바탕으로 광금전초 추출물의 항류마티스 효과를 임상적으로 입증하기 위한 후속 연구가 행해져야 하며, 이를 통해 광금전초 추출물이 항류마티스 제제 개발의 후보 물질이 될 수 있을 것이다.

결 론

본 연구를 통하여 광금전초 추출물은 인간 활막 세포에서 TNF- α 로 유도된 MMP-1과 MMP-3 발현을 유의하게 억제하였다. 그 기전으로는 MAPK의 인산화를 억제하고, 전사인자인 AP-1의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 CIA 마우스 모델에서도 유의적인 관절염 억제효과를 보이는 것을 확인하였다. 이런 결과들은 광금전초 추출물이 류마티스 관절염에서 예방물질 및

치료제의 후보 물질이 될 수 있는 실험적 근거로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행되었습니다.

References

- Pap T, Muller LU, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:361-7.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada K. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:455-64.
- Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum.* 2008;59:1690-7.
- Crisp AJ, Armstrong RD, Grahame R, Dussek JE. Rheumatoid lung disease, pneumothorax, and eosinophilia. *Ann Rheum Dis.* 1982;41:137-40.
- Joana FF, Alaa AAM, Paul E. Glucocorticoids and Rheumatoid Arthritis. *Rheum dis Clin North Am.* 2016;42:33-46.
- Taukumova LA, Mouravjoy Yu V, Gribakin SG. Mucocutaneous side effects and continuation of aurotherapy in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;455:367-73.
- Kim YJ, Song M, Ryu JC. Inflammation in methotraxate-induced pulmonary toxicity occurs via the p38 MAPK pathway. *Toxicology.* 2009;256:183-90.
- Konttinen TY, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne R, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:691-7.
- Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis-targeting gelatinase A activation. *Inflamm Res.* 2001;50:183-6.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.*

- 1996;14:397-440.
11. Noh EM, Kim JS, Hur H, Park BH, Song EK, Han MK, Kwon KB, Yoo WH, Shim IK, Lee SJ, Youn HJ, Lee YR. Cordycepin inhibits IL-1 β -induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *RHEUMATOLOGY*. 2009;48:45-8.
 12. Kim CM, Shin MK, Lee KS, Ahn DK. Great Dictionary of chinese Medicine. Junngdam, Seoul, Press 1999;pp 369-71.
 13. Hwang JK, An CG, Kim SC, Lee SH, Park SH, Ryu DG, Lee GS, Lee YR, Kim BS, Kwon KB. Extracts of Desmodii Herba Inhibits of TPA-induced invasion in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *Journal of Physiology & Pathology Korean Medicine*. 2014;28:494-8.
 14. Hwang JK, Noh EM, Moon SJ, Kim JM, Kwon KB, Park BH, You YO, Hwang BM, Kim HJ, Kim BS, Lee SJ, Kim JS, Lee YR. Emodin suppresses inflammatory responses and joint destruction in collagen-induced arthritic mice. *Rheumatology*. 2013;52:1583-91.
 15. Pretzel D, Pohlers D, Weinert S, Kinne RW. In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R25.
 16. Rooney T, Roux-Lombard P, Veale DJ, FitzGerald O, Dayer JM, Bresnihan B. Synovial tissue and serum biomarkers of disease activity, therapeutic response and radiographic progression: analysis of a proof-of-concept randomised clinical trial of cytokine blockade. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:706-14.
 17. Paunovic V, Harnett MM. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013;73:101-15.
 18. Filipovic I, Walker D, Forster F, Curry AS. Quantifying the economic burden of productivity loss in rheumatoid arthritis. *RHEUMATOLOGY*. 2011;50:1083-90.
 19. Zhao S, Otieno F, Akpan A, Moots RJ. Complementary and alternative medicine use in Rheumatoid arthritis: Considerations for the pharmacological management of elderly patients. *Drugs Aging* 2017;34:255-64.
 20. Kolasinski SL. Herbal medicine for rheumatic diseases: promises kept? *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:617-23.
 21. 한국전통저식포탈의 약재/처방/병증 DB. Available from:<http://www.koreantk.com/ktkp2014/medicine/medicine-view.view?medCd=M0000333>, accessed 31/5/17.
 22. Georg S, Makiyeh TA, Josef SS, Beatrice JS, Carl-Walter S, Peter B, Peter Z, Kurt R, Qingbo X, Günter S. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2000;43:2501-12.
 23. Lindsey AM, Derrick JT. Kinase inhibitors: The next generation of therapies in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum. Dis*. 2014;17:359-68.
 24. Verica P, Margaret MH. Mitogen-Activated Protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013;73:101-15.
 25. Abdelhamid L, Judith S, Wen Qing L, Muhammad Z. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2002;23:251-62.
 26. Jacques M, Francis B. Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2004;71:503-10.
 27. Francois R, Mathias F, Marie TC, Francis, B. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2006;73:29-36.