

지골피 추출물이 류마티스관절염 관련 매개체에 미치는 영향

장아영¹ · 승오탁² · 이명선^{1†}

¹대전대학교, ²중부대학교

(2019년 9월 8일 접수: 2019년 10월 2일 수정: 2019년 12월 28일 채택)

The effect of Lycii radicis CORTEX extracts on the Rheumatoid arthritis related factors

Jang Ayeong¹ · Seung Otak² · Lee Myeongseon¹

¹DaeJeonUniversity, ²JoongBu University

(Received September 8, 2019; Revised October 2, 2019; Accepted December 28, 2019)

요 약 : 본 연구는 CIA로 유도된 류마티스 관절염 모델에서 지골피 추출물이 류마티스관절염 관련 인자에 미치는 영향을 평가하였다. 동물 모델에 류마티스관절염을 유발한 후 지골피 추출물을 4주간 200 mg/kg/day 용량으로 경구 투여하였다. 이후 혈액, 방사선 및 조직 분석에 기초하여 효과를 평가하였다. 그 결과, 대조군에 비해 지골피 추출물은 사이토카인, 케모카인 및 면역글로불린 생성을 유의하게 감소시켰다. 또한, 지골피 추출물은 중족골을 효과적으로 보존하였으며, H&E 및 M&T 염색에서도 대조군에 비해 조직 병리학적 개선이 있음을 보여주었다. 이와 같은 결과는 지골피 추출물이 류마티스관절염 증상을 완화시켰음을 나타내고 있다. 따라서 지골피 추출물은 류마티스 관절염 관리를 위한 새로운 치료옵션이 될 수 있다.

주제어 : 류마티스관절염, 사이토카인, 면역글로불린, 지골피 추출물, 방사선, 조직

Abstract : The present study aimed to evaluate the effect of Lycii radicis CORTEX extract on rheumatoid related factors in CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. Lycii radicis CORTEX extract was administered orally at doses of 200 mg/kg/day for 4 weeks after direct injection of CIA into the mice' right paw. We evaluated the treatment effects based on serum biomarkers, morphological and histopathological analyses of the paw. Compared with those in control mice, the Lycii radicis CORTEX extract treatments significantly reduced the serum concentration of cytokine, kemokine and immunoglobulin levels. In addition, the Lycii radicis CORTEX extract treatments effectively preserved the paw bone joint, that in the H&E staining and masson-trichrome staining showed that there were histopathological improvements in Lycii radicis CORTEX extract treated group compared to those of control group. The results indicate

[†]Corresponding author
(E-mail: leesun1460@hanmail.net)

that Lycii radidis CORTEX extract alleviated rheumatoid arthritis symptoms. Thus, Lycii radidis CORTEX extract may be a novel therapeutic option for the management of rheumatoid arthritis.

Keywords : Rheumatoid arthritis, cytokine, immonoglobulin, Lycii radidis CORTEX extract, micro-CT, tissue

1. 서론

자가 면역질환은 생활환경, 스트레스와 같은 환경, 사회적 요인으로 발생하는 질환으로 아토피 피부염과 같은 피부질환, 천식과 같은 호흡기질환과 더불어 류마티스관절염(Rheumatoid arthritis)은 인체의 면역력 저하로 인해 관절에 발생한 지속적인 염증반응을 쉽게 제거하지 못해 관절 손상과 운동능력 장애가 나타나는 염증성 자가면역 질환 중 하나이다[1]. 이와 같은 류마티스관절염은 일반적으로 약 1% 정도의 발병률을 보이며 [2], 예전에는 주로 여성에게 주로 발생하는 것으로 알려져 있으나, 최근 통계학적 수치로는 고령화에 의한 발병 시 성별에 의한 빈도 차이는 감소하는 것으로 보고되어 류마티스관절염은 남녀 노소 구분 없이 발생할 수 있는 질환으로 간주되고 있다[3-5]. 특히, 국가통계포털 자료에 따르면 [6], 류마티스관절염으로 인한 환자 수와 진료비는 2015년 156만 명/약 3,640억 원에서 2017년 170만 명/약 4,830억 원으로 증가하는 것으로 보고되었고 미세먼지와 같은 환경오염이 가속화됨에 따라 면역기능이 저하되는 사회적 측면을 고려할 때, 앞으로도 류마티스관절염 환자는 지속적으로 늘어날 것으로 보인다.

활막의 염증반응과 관절의 부종과 통증을 주된 특징으로 하는 류마티스관절염의 치료제로는 IL-6 길항제인 tocilizumab과 TNF- α 길항제인 infliximab이 사용되지만, 고가의 비용과 더불어 일부 환자에게는 치료 반응이 적거나 신장, 간 기능 장애와 같은 부작용이 발생한다고 알려지거나 이러한 한계점을 벗어나고자 전 세계적으로 화학적 약물이 아닌 천연물을 활용한 치료제 연구에 많은 투자가 진행되고 있다[7-9].

본 연구에 사용된 지골피는 구기자나무의 근피로서, 한의학에서는 뼈에 열감이 있는 것을 없애 주며, 살이 뜨거운 것을 풀어주며, 뼈를 지원하게 해준다는 효능과 함께 정기를 더해 주어 면역력을 높일 수 있는 약재로 알려져 있다[10]. 지골피의

실험적 연구로는 천식[11], 당뇨[12], 우울증[13] 등의 효능을 검증하였는데, 이중 서 등[11]이 지골피를 활용하여 류마티스관절염과 유사한 면역 질환인 천식 동물에서의 효과를 보고한 결과와 지골피의 문헌적 효능을 바탕으로 류마티스관절염에 대한 효능을 확인하고자 하였다. 이에 따라 류마티스관절염 질환에 활용될 수 있는 기초적 자료를 제공하고자 류마티스관절염을 유발한 동물모델을 제작하여 지골피 추출물을 4주간 경구 투여하였고 이후 혈액 및 조직, 방사선 검사를 진행함으로써 지골피를 활용한 식·의약품 소재로서의 가능성을 도출하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 조제

대전광역시 한약재 거리에서 구매한 중국산 지골피(Lycii radidis, CORTEX) 50 g에 증류수 1,000 ml를 넣어 3시간 동안 환류 추출한 후 여과한 액상을 감압 농축기를 활용하여 농축하였다. 농축된 용액을 동결건조기로 동결 건조하여 얻어낸 분말 6.9 g (수율 13.8%)을 4°C에서 냉장 보관하며 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS : Welgene Co., Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), Mouse IgM ELISA kit (eBioscience CO., U.S.A), Mouse IgG ELISA kit (eBioscience CO., U.S.A), Mouse cytokine multiplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였다. 또한, 기기는 세포 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), 안전 무균 작업대 (Vision scientific Co., Korea), 플레이트 믹서기 (Lab-Line Co., U.S.A.), 흡광도 측정기

(Molecular Devices Co., U.S.A.), 조직 현미경 (Carl Zeiss, Co., Germany), Luminex (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2.3. 실험동물 및 처치

실험동물은 수컷 5주령의 DBA/1 생쥐 (16~22 g)는 라온바이오(주) (Korea)에서 공급 받아 실험기간 내 사료와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 사육하였으며, 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인 (동물사용 윤리위원회 승인번호-DJUARB 2019-014)을 받아 동물 윤리원칙에 따라 실험하였다.

류마티스관절염 동물제작은 2 mg/ml 농도의 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete freund's adjuvant (CFA)와 1:1의 비율로 혼합하며, 혼합액 0.1 ml (제2형 콜라겐 100 μg)을 꼬리의 기저부에서 1.5~3 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하여 1차 유발을 하였다. 1차 유발 후 2주 후에 1차시기와 동일하게 CFA 대신 incomplete freund's adjuvant (IFA)과 혼합하여 한쪽 발바닥에 주사하여 유발하였다. 실험은 4개의 그룹으로 나누었으며 4주 동안 매일 1회, 오후 2시에 류마티스관절염을 유발하지 않은 정상군은 자유식이만(이하, Normal), 류마티스관절염만을 유발한 대조군에는 증류수만을(이하, Control), 양성대조군인 indomethacin 투여군(이하, Indo), 지골피 추출물을 200 mg/kg/day로 투여하는 실험군(이하, LRC)으로 나누어 각각 200 μl 씩 투여하였다. 이때 각 그룹간의 동물은 식약처 가이드라인에 따라 시험결과의 통계학적 유의성을 평가할 수 있도록 유발 정도가 비슷한 동물을 무작위 배당을 통해 6마리로 하였고 실험 동물의 수명 및 약물 효과가 발현되는 시간을 고려하여 노령화에 의한 변수를 최소화하기 위해 13주령을 넘기지 않도록 4주로 최종 설정하였다.

2.4. 혈액 검사

4주간의 투여 종료 후 혈액검사를 진행하기 위해 마취된 동물을 심장채혈을 통해 채혈한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 확보하였다. 확보된 혈액을 통해 다음과 같은 항목을 측정하였다.

2.4.1. 간 및 신장 기능검사

간(AST, ALT) 및 신장(creatinine, BUN) 검사를 진행하기 위해 분리한 혈청을 서울의과학연구소(Korea)에 분석 의뢰하였다.

2.4.2. 사이토카인 및 케모카인 측정

사이토카인 및 케모카인을 측정하기 위해 Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit를 이용하여 IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-21, TNF- α , MCP-1, GM-CSF 등을 혈청을 통해 kit에 구성된 물품을 가지고 제조사의 프로토콜에 맞춰 반응시킨 뒤 Luminex 기기로 측정하였다.

2.4.3. 면역글로불린 측정

면역글로불린 측정을 위해 Mouse IgM ELISA kit과 Mouse IgG ELISA kit을 이용하여 혈청을 통해 kit에 구성된 물품을 가지고 제조사의 프로토콜에 맞춰 반응시킨 뒤 ELISA 기기로 측정하였다.

2.5. 방사선 및 structural parameter 검사

실험종료 후 류마티스관절염을 유발한 후족부를 잘라낸 조직을 투명글라스에 고정시킨 후 10% 중성 포르말린에 넣어 라온바이오(주)에 분석 의뢰하였고 방사선 검사는 후족부 전체를 micro-CT 촬영 후 3D 작업을 수행하였으며, structural parameter 검사는 종족골을 기준으로 골밀도 (bone volume)과 골 수치 (bone surface)에 대한 수치를 기준으로 관절 염증 정도를 확인하였다.

2.6. 조직 검사

실험종료 후 방사선 검사가 종료된 조직을 KP&T (Korea)에 의뢰하여 H&E 및 M&T 염색을 진행하였고 이를 조직현미경에서 관찰한 후 병변 부위를 촬영한 결과를 가지고 분석을 진행하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험결과는 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(** p <0.001, * p <0.01, * p <0.05).

3. 결과 및 고찰

3.1. 간 및 신장 기능

현재 항TNF- α 제제, 비스테로이드성 소염제, 아스피린, 단순 소염제, 부신피질호르몬, DMARD(disease modifying anti rheumatic drug), 면역억제제 등은 류마티스관절염 임상에서 광범위하게 사용되고 있으나 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 다양한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 천연물 탐색과 개발에는 우선으로 안전성이 확보된 연구가 필요하다 [14-15]. 또한, 간혹 한약과 같은 한의학적 천연물에 대한 복용이 간 수치를 높인다는 인식이 존재한 까닭에 이러한 점을 과학적으로 증명은 필요한 실정이다.

본 연구에서 지골피 추출물에 관한 안전성 확보를 위해 간 및 신장 검사를 진행한 결과, 지골피 추출물을 투여한 실험군은 정상군과의 차이를 보이지 않았고 지골피를 활용한 여러 연구에서도 세포와 동물실험에서 독성이 나타나지 않은 결과

와 현재 임상에서도 주로 사용되고 있다는 측면에서 안전성이 있음을 보여주고 있다.

3.2. 사이토카인 및 케모카인 생성량

류마티스관절염의 병리학적 원인은 크게 두 단계로 나눌 수 있는데, 초기에는 관절 구성 성분이 자가 면역성을 획득하여 조직이 면역 반응이 일어나게 됨으로써 T세포가 항원 제시 세포를 인식하여 IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF, MCP와 같은 사이토카인과 케모카인이 관절 내로 모여들게 된다[16,17]. 이후 관절에 침투한 세포를 활액 세포에 의해 생산되는 염증성 사이토카인이 류마티스관절염을 일으키는 주된 원인이 된다[18]. 또한, 최근에는 Th17 세포 활성화로 인해 IL-17과 IL-21 등이 류마티스관절염에서 중요한 원인으로 밝혀지고 있어 사이토카인과 케모카인 생성량 지표가 중요한 척도로 여겨지고 있다[19,20].

본 연구에서 지골피 추출물에 관한 사이토카인 및 케모카인 생성량을 확인한 결과, 지골피 추출물을 투여한 실험군은 류마티스관절염만을 유발한 대조군에 비해 염증 및 류마티스관절염에 관

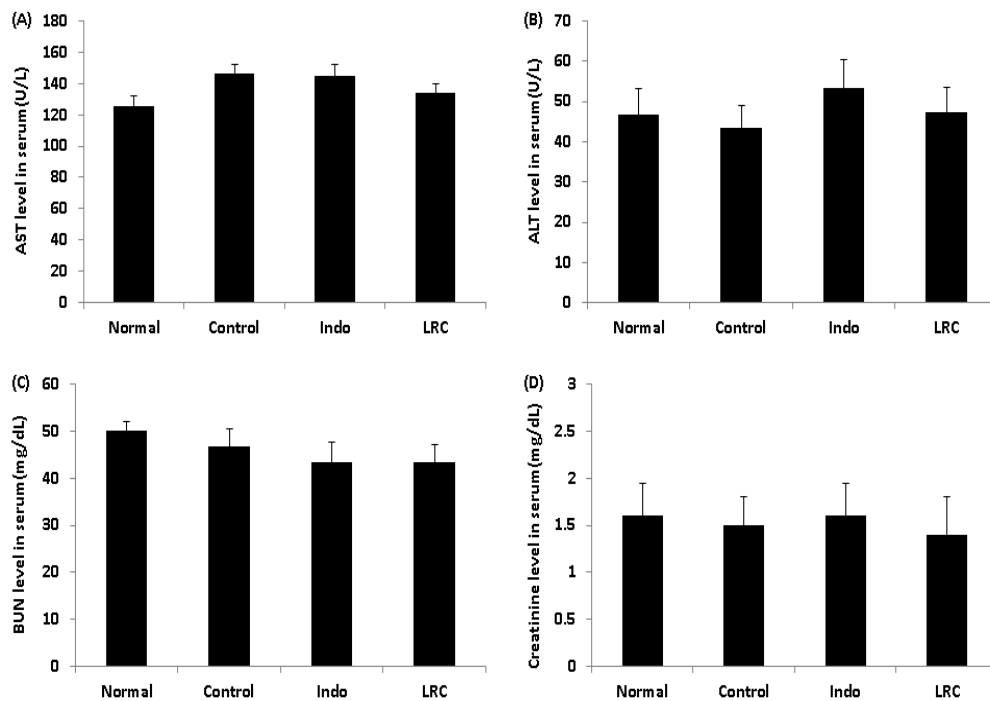


Fig. 1. Effects of LRC on the level of liver, and kidney in the serum. The results were represent the mean \pm S.D. The data is (A), AST; (B), ALT; (C), BUN; (D), creatinine.

련된 대표적 사이토카인과 케모카인을 유의성 있는(** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소가 확인되었다. 이와 같은 결과는 지골피 추출물이 양성대조군과 유사하거나 더 좋은 결과를 나타내는 결과를 미루어볼 때, 류마티스관절염을 개선할 수 있는 치료제나 다른 원료로서의 개발이 가능하고 나아가 본 연구결과를 바탕으로 타 질환에도 응용할 수 있음을 보여주고 있다. 다만, IL-17 생성량의 결과는 대조군 대비 감소하는 것으로 나타났으나, 유의성이 나타나지 않은 점은 생성량이 적은 까닭에 통계적으로 유의적 차이가 확인되지 않았기에 이는 추후 민감성이 높은 측정을 진행함으로써 다시 검증해봐야 할 문제로 판단된다.

3.3. 면역글로블린 생성량

면역글로블린은 인체에 침입한 병원균이나 미생물에 대항하는 당단백질로써[21], 최초 면역 반응에서는 IgM이 생성되고 이후 면역 반응은 주로 IgG가 담당하여 2차 면역과정 동안 대량 생산된 면역글로블린의 보체 연쇄 반응 활성화로 진행되어 대식세포의 탐식 작용을 돕게 된다[21]. 류마티스 매개체 (rheumatoid factors) 내 자가 항체가 IgM으로 정상 순환 중인 IgG와 결합하여 IgM-IgG 복합체를 형성하고 관절에 침착되어 류마티스관절염이 발생된다[25]. 이때 IgG는 혈액에서 감염 부위로 이동하는 호중구와 Fc 수용체와의 결합을 통해 케모카인이 단핵구로 하여금 대식세포로 분화하여 염증 유발물질을 제거하는 역할을 하게 되므로 IgM과 IgG의 생성량은 질환의 신속한 개선을 확인할 수 있는 지표라고 할 수 있다[22,23].

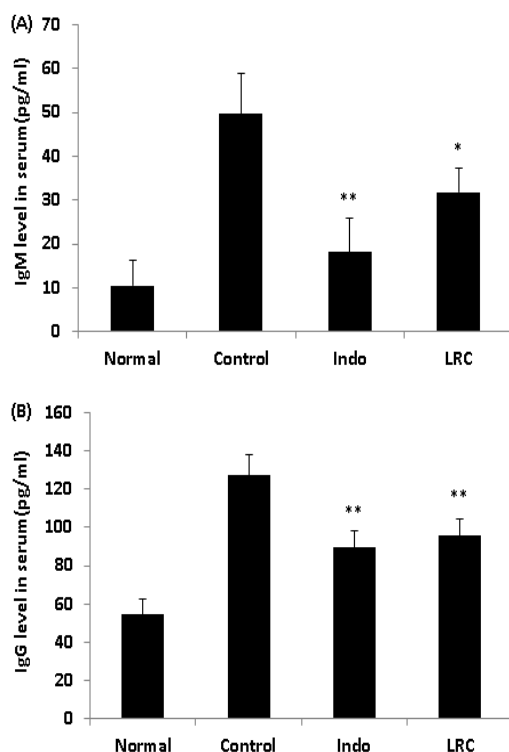


Fig. 2. Effects of LRC on the level of immunoglobulin in the serum. The results were represent the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's *t*-test (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

Table 1. Effects of LRC on the level of cytokine, and kemokine in the serum

Groups	Normal	Control	Indo	LRC
IL-1β	217.5±70.4	754.9±60.2	470.5±40.8**	538.4±50.0**
IL-6	423.6±78.8	688.9±80.4	377.6±75.6*	379.3±88.5**
IL-17	9.7±0.3	13.6±1.1	10.3±0.2	10.1±0.4
IL-21	88.6±10.6	192.8±13.2	101.6±12.8**	130.4±14.6*
TNF-α	134.8±30.5	312.6±31.2	244.9±20.5*	221.9±30.8*
GM-CSF	90.8±25.6	289.1±85.3	121.6±21.7**	198.8±19.3*
MCP-1	437.9±40.8	1035.7±132.9	666.9±100.1*	648.6±54.8**

The results were represent the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's *t*-test (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

본 연구에서 지골피 추출물에 관한 IgM 및 IgG 생성량을 확인한 결과, 지골피 추출물을 투여한 실험군은 류마티스관절염만을 유발한 대조군에 비해 유의성 있는(** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$) 감소가 확인되었다. 이와 같은 결과는 앞선 사이토카인 및 케모카인 결과와 종합적으로 확인하였을 때, 지골피 추출물 투여가 IgM과 IgG 생성을 대조군보다 신속히 제거하고 있으며, 앞선 류마티스관절염의 대표적 지표인 사이토카인과 케모카인 생성량을 억제하는 결과와도 부합됨에 따라 질환 개선에 도움을 줄 수 있음이 혈액학적 검사를 통해 확인되었다.

3.4. 방사선 및 structural parameter, 조직 검사

류마티스관절염의 특징으로는 손과 발의 관절에 주로 발병되며, 중족골 관절에서 만성 염증반응이 장시간 지속됨으로써 관절통의 발생과 더불어 관절의 변형과 파괴, 골밀도 감소가 영구적으로 나타나는 것이 특징이다[24].

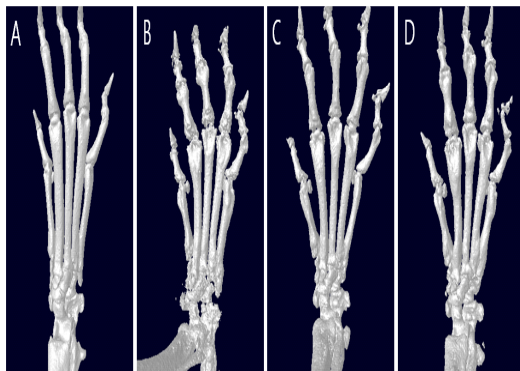


Fig. 3. Micro-CT images of hind paws of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. A, Normal; B, Control; C, Indo; D, LRC.

본 연구에서 지골피 추출물에 관한 방사선 및 골 염증 수치를 확인한 결과, 지골피 추출물을 투여한 실험군은 류마티스관절염만을 유발한 대조군에 비해 중족골과 근위 관절의 변형뿐만 아니라 마디 사이의 파괴가 적게 나타났음이 방사선 검사를 통해 확인되었다. 또한, 중족골을 기준으로 structural parameter 검사를 통해 관절 염증 수치 역시 대조군 대비 유의성 있게(* : $p < 0.05$) 적은 것으로 나타났으며, 조직 검사를

통해서도 대조군보다 면역세포의 침윤, 연골 침하, 활막 세포 손상이 상대적으로 적게 나타난 것을 확인하여 혈액학적 검사 결과에서 나타난 결과의 해석을 뒷받침할 근거를 마련하였다.

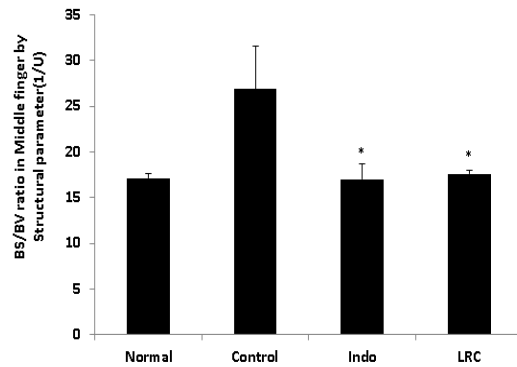


Fig. 4. Effects of LRC that reduced BS (bone surface) / BV (bone volume) ratio using 3D Micro-CT of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with Control group by student's *t*-test (Significance of results, * : $p < 0.05$).

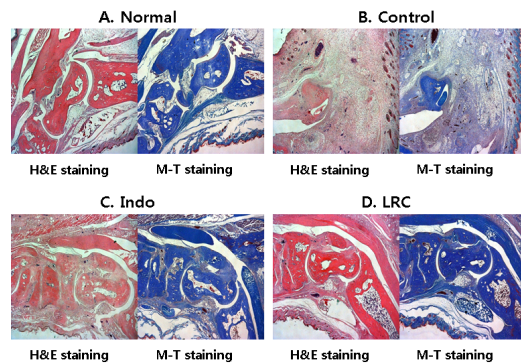


Fig. 5. Effects of BHT histopathologic examination analysis of collagen-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The sections were counterstained with hematoxylin & eosin (H&E), masson-trichrome (M-T). Original magnifications : x 25.

4. 결론

본 연구는 지골피 추출물의 투여가 류마티스관절염 관련 매개체에 미치는 영향을 확인하기 위해 류마티스관절염을 유발한 동물모델에 4주간 경구 투여한 후 혈액 및 방사선, 조직 등의 검사를 진행한 결과는 다음과 같다.

1. 지골피 추출물의 투여는 간 및 신장 기능 검사에서 정상군과 큰 차이가 나타나지 않았다.
2. 지골피 추출물의 투여는 IL-1 β , IL-6, IL-21, TNF α , GM-CSF, MCP-1 등과 같은 사이토카인 및 케모카인 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰으나, IL-17 생성은 유의성이 나타나지 않았다.
3. 지골피 추출물의 투여는 IgM 및 IgG 등의 면역글로블린 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
4. 지골피 추출물의 투여는 방사선 검사를 통해 관절의 변형과 마디 사이의 골 손실이 적은 것으로 확인되었으며, 골 염증 수치에서도 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다. 또한, 조직 검사를 통해 대조군에 비해 면역세포의 침윤, 연골 침하, 활막 세포 손상이 적은 것이 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 지골피 추출물이 류마티스관절염에 활용될 수 있는 식·의약품 소재임을 증명하고자 진행한 혈액 검사에서 류마티스관절염의 대표적 매개체인 사이토카인 및 케모카인, 면역글로블린 등에 대한 효능이 확인되었으며, 방사선 및 조직 검사를 통해 이와 같은 가설을 더욱 증명하였다. 따라서 추후 전 임상 단계에서 증명된 결과를 바탕으로 임상시험에 활용할 수 있는 연구가 좀 더 보완되어 구체적으로 진행된다면 류마티스관절염에 대한 지골피의 가치는 더욱 높아질 것으로 생각된다.

References

1. D. L. Scott, F. Wolfe, T. W. Huizinga, "Rheumatoid arthritis", *Lancet*, Vol.376,

- No.3, pp. 1094-1108, (2010).
2. A. J. Silman, J. E. Pearson, "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis", *Arthritis Res*, Vol.4, No.2, pp. 265-272, (2002).
3. T. M. Hunter, N. N. Boytsov, X. Zhang, K. Schroeder, A. B. Araujo, "Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases", *Rheumatology international*, Vol.37, No.9, pp. 1551-1557, (2017).
4. E. Minichiello, L. Semerano, M. C. Boissier, "Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: a systematic literature review", *Joint Bone Spine*, Vol.83, No.6, pp. 625-630, (2016).
5. Y. R. Ki, "The Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes in Rheumatoid Arthritis Patients: A Propensity Score Analysis", *Korean Journal of Clinical Pharmacy*, Vol.29, No.2, pp. 109-114, (2019).
6. http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=350&tblId=TX_35001_A061&conn_path=I2
7. Y. H. Cheon, H. O. Kim, Y. S. Suh, J. H. Hur, W. Jo, H. S. Lim, S. I. Lee, "Inhibitory effects for rheumatoid arthritis of dietary supplementation with resveratrol in collagen-induced arthritis", *Journal of Rheumatic Diseases*, Vol.22, No.2, pp. 93-101, (2015).
8. M. Feldmann, F. M. Brennan, R. N. Mainil, "Role of cytokines in rheumatoid arthritis", *Annual Review of Immunology*, Vol.14, No.3, pp. 397-440, (1996).
9. S. H. Ahn, H. H. Ki, "Lonicerae Flos Inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS Induced Arthritis of Mouse through Regulation of MI", *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, Vol.24, No.2, pp. 242-248, (2010).
10. T. S. Kim, W. J. Park, S. B. Ko, M. H. Kang, "Development of extracts of Lycii folium having high antioxidant activity", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.37, No.10,

- pp. 1318–1322, (2008).
11. C. W. Seo, Y. C. Lee, J. C. Lee, “The Effects of Lycium chinese Mill., Morus alba L. and Their Combination on the Asthmatic Murine Model”, *Herbal Formula Science*. Vol.21, No.1, pp. 36–50, (2013).
 12. Y. Han, Y. K. Park, “The comparisons of Lycii Radicis Cortex and Corni Fructus water extract effects on streptozotocin-induced diabetes in rats”, *The Korea Journal of Herbology*. Vol.28, No.6, pp. 71–77, (2013).
 13. D. K. Koh, T. H. Lee, “Antistress effects of Lycii Radicis Cortex in the passive avoidance test and the forced swimming test”, *The Korea Journal of Herbology*. Vol.22, No.2, pp. 137–146, (2007).
 14. H. Matthew, S. Kirk, “The anti inflammatory and antiviral effects of hydroxy chloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis”, *Arthritis Rheum*, Vol.39, No.1, pp. 157–161, (1996).
 15. J. S. Song, “Toward the cure of rheumatoid arthritis”, *The Korean Journal of Medicine*, Vol.69, No.6, pp. 581–589, (2005).
 16. J. M. Kim, H. Y. Kim, “Pathogenesis of rheumatoid arthritis”, *J Korean Med Assoc*, Vol.53, No.10, pp. 853–861, (2010).
 17. J. Sylvester, A. Liacini, W. Q. Li, F. Dehnade, M. Zafarullah, “Tripterygium wilfordii Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor- κ B activities”, *Molecular pharmacology*, Vol.59, No.5, pp. 1196–1205, (2001).
 18. P. F. Zangerle, D. De Groote, M. J. Lopez, R. J. Meuleman, Y. Vrindts, F. Fauchet, P. Franchimont, “Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood: II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis”, *Cytokine*, Vol.4, No.6, pp. 568–575, (1992).
 19. W. P. Arend, J. M. Dayer, “Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum*, Vol.38, No.2, pp. 151–160, (1995).
 20. Y. W. Song, “Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis”, *The Korean Journal of Medicine*, Vol.76, No.1, pp. 1–6, (2009).
 21. Korean College of Rheumatology, KCR Textbook of rheumatology. Seoul: GunJachulpansa, pp. 73, 187–200, (2014).
 22. S. M. Choi, K. Y. Lee, H. S. Lee, J. H. Hong, M. H. Lee, B. C. Lee, “A case of meningococcal meningitis with complement 9 deficiency”, *Korean Journal of Pediatrics*, Vol.48, No.1, pp. 101–103, (2005).
 23. B. J. Lee, S. Y. Yoon, H. W. Park, J. H. Park, I. Y. Cho, J. S. Lee, J. H. Ryu, “Effects of Concurrent Administration of Hyeolbuchukeo-tang and Aspirin on Atherosclerosis in the ApoE^(-/-) Mouse”, *Journal of Korean Medicine*, Vol.32, No.1, pp. 164–174, (2011).
 24. G. H. Son, Y. S. Kim, J. G. Jung, Y. G. Park, “Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice”, *The Korea Journal of Herbology*, Vol.26, No.3, pp. 1–6, (2011).