

원 저

교원질로 유발된 관절염에서 가시오가피가 calpain의 발현에 미치는 영향에 대한 면역조직화학적 연구

오충환, 김순중, 서일복¹⁾

세명대학교 한의과대학 재활의학교실, 해부학교실¹⁾

Immunohistochemical Study on the Effects of *Cortex Acanthopanax Senticosi* on the Expression of Calpain in Collagen-Induced Arthritis in Rats

Chung-Whan Oh, Sun-Jung Kim, Il-Bok Seo¹⁾

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Department of Anatomy¹⁾,
College of Oriental Medicine, Semyung University

Objectives: Calpain, a calcium-dependent cysteine proteinase, may be one of the proteolytic enzymes that mediate cartilage degradation associated with rheumatoid arthritis. The object of this study is to ascertain immunohistochemically whether calpain is present in the inflamed joints of collagen-induced arthritis of rats, and examine the effect of *Cortex Acanthopanax Senticosi* on the expression of calpain.

Methods: Male Lewis rats, around 200g of body weight, were immunized with bovine type II collagen. After 3 weeks from first immunization, rats were divided into arthritic control (n=6) group and *Cortex Acanthopanax Senticosi*-treated (n=6) group. Non-immunized rats served as the normal (n=6) group. All animals were sacrificed at 15 days post-treatment and tibiotarsal joints were removed. Calpain immunohistochemistry was performed on the midsagittal section of the tibiotarsal joint.

Results: All animals of the control and treated groups showed ankylosing osteoarthritis. However, the animals of the treated group showed alleviation in the fibrous ankylosis, destruction of articular cartilage and destruction of subchondral bony tissue compared with the animals of the control group. Calpain was expressed in the chondrocyte lacunae of growing articular cartilage, in the skeletal muscle fibers, in the peripheral nerves, and in the vessel walls around the joints of all groups. In the control and treated groups, calpain was also expressed in proliferating synovial epithelia, subsynovial stroma cells, surface of articular cartilage, and fibrous pannus around destructive subchondral bony tissue. However, the expression density of calpain in the treated group was diminished compared with the control group, especially in surface of articular cartilage and fibrous pannus.

Conclusions: These observations indicated that calpain plays an important role in the destruction of cartilage and bone in collagen-induced arthritis of rats, and also indicated that *Cortex Acanthopanax Senticosi* inhibits the development of arthritis by decreasing the expression of calpain. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):98-104)

Key Words: *Cortex Acanthopanax Senticosi*, collagen-induced arthritis, calpain, rat, immunohistochemistry

· 접수: 2002년 8월 1일 · 채택: 2002년 10월 14일
· 교신저자: 서일복, 충북 제천시 신월동 산 21-1 세명대학교 한의과대학
(Tel. 043-649-1344, Fax. 043-649-1349, E-mail: scoib@semyung.ac.kr)
· 연구비 지원: 본 연구의 일부는 2001년도 세명대학교 교내 학술비 지원에 의해서 수행됨

서 론

류마트성 관절염(rheumatoid arthritis)은 골관절염(osteoarthritis) 다음으로 호발되는 관절질환으로 전세계적으로 인구의 약 1%가 이완되어 있는 난치성 병으로 알려져 있다¹⁾. 이 질환은 만성 전신성 염증병변의 일환으로 주로 대칭성으로 손목 및 손의 작은 관절을 침범하며, 초기에는 비화농성 증식성 활막염을 일으키며, 진행되면 관절연골의 파괴와 관절의 강직증을 초래하게 된다²⁾. 이 질환의 원인 및 발병기전은 면역유전적으로 감수성을 가진 숙주가 미생물인 항원에 노출됨으로써 시작된다고 보고 있으나^{3,4)} 아직 그 원인 및 발병기전은 완전히 규명되지 못하였고, 또한 이 질환을 완치시킬 수 있거나 질병의 진행을 막을 수 있는 적절한 치료방법이 정립되지 못하고 있는 실정이다.

Trentham 등⁵⁾이 설치류에서 collagen을 접종하여 collagen-induced arthritis(CIA) 동물모델을 확립한 이래, 임상적, 병리조직학적 및 면역학적으로 사람의 류마트성 관절염과 매우 유사함이 확인되어^{6,7,8)} 류마트성 관절염 연구에 널리 이용되고 오고 있다. 류마트성 관절염 및 CIA에서 골조직 및 연골조직의 파괴성 병변이 진행됨에는 collagenase⁹⁾, stromelysin¹⁰⁾, cathepsin B¹¹⁾ 등의 여러 단백질분해효소가 관련됨이 알려져 왔다. 한편 사람의 류마트성 관절염에서 calpain의 발현이 증가됨이 확인되고¹²⁾, 또한 Fujimori 등¹³⁾은 mice의 collagen 유발 관절염에서 calpain의 발현이 증가됨을 관찰하여, calpain이 류마트성 관절염에서 골조직 및 연골조직의 파괴에 밀접한 관련이 있음이 시사되어 왔다.

필자 등은 가시오가피가 CIA모델에서, 혈중 cytokine 분석 및 병리조직학적 검사로, 치료효과가 있음을 보고 확인한 바 있다¹⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 rat의 CIA 병리발생에도 calpain이 관련되는지를 확인하고, 또한 가시오가피가 CIA에 있어서 calpain의 발현에는 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 130g 내외의 숫컷 SPF Lewis Rat(Harlan Sprague Dawley Inc., USA)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 항온항습사육장치(대중기 기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다.

2. 약물 및 검액의 제조

실험에 사용된 가시오갈피(Cortex Acanthopanax Senticosi)는 국내의 삼척 가시오가피 농장(영농법인)에서 구입하여 엄선하여 사용하였으며, 가시오갈피 140g을 1,000ml의 증류수에 1시간 동안 침지시킨 후, 2시간 30분 동안 전탕하였다. 전탕액을 여과포로 여과한 후, 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 200ml로 농축하였으며, 농축액 1ml을 1회 경구투여량으로 하였다.

3. 관절염의 유발

Bovine type II collagen(Sigma Co., USA)을 0.05M acetic acid에 6mg/ml의 농도로 넣고 4℃에서 12시간 이상 교반하여 용해하고, N-acetylmuramyl L-alanyl D-isoglutamine(MDP)(Sigma Co., USA)을 증류수에 2mg/ml의 농도로 넣고 4℃에서 교반하여 용해하였다. 접종 당일에 collagen 용액과 MDP 용액을 1:1로 섞어, 혼합하고, 이 용액을 동량의 Freund's incomplete adjuvant(Sigma Co., USA)와 섞어 조직분쇄기(Biospec Products, Tissue Tearor, USA)를 이용하여 현탁액으로 만들었다. 20마리의 흰쥐를 대상으로 미근부의 피내 2곳에 현탁액 각각 0.1ml씩 총 0.2ml을 접종하였다. 7일 후에 동일한 방법으로 제조한 현탁액 0.1ml을 미근부의 피내에 추가 접종하여 관절염 모델군(model group)으로 하였다. 정상군(normal group)으로 사용할 6마리에는 상기의 접종액 중 collagen만을 제외한 액을 동일한 방법으로 접종하였다.

4. 실험군의 분류 및 처치

1차 Collagen 접종 3주 후에 모델군(model group)에서 육안적으로 후지의 발적 및 종창이 확인된 개체를 대상으로 좌우 족근관절(tarsal joint)의 폭을 digital calipper(Mitutoyo, CD-15CP, Japan)를 이용하여 각각 3회 측정하고 좌우의 평균값을 구한 후 폭이 7.85mm이상인 개체를 선별하여, 군 당 족근관절의 폭이 유사하도록 6 마리씩을 대조군(control group)과 처치군(treated group)에 배정하였다. 정상군 및 대조군에는 증류수 1ml을, 처치군에는 한약감압농축액 1ml을 1일 1회 15일간 경구투여 하였다.

5. 병리조직학적 관찰

실험종료일에 우측 족근관절이 포함되도록 경골의 원위부에서 중족골 원위부사이를 적출하여 10%중성 포르마린 용액에 1일간 고정한 후, 20% formic acid에 침지시켜 3일간 탈회하였다. 탈회된 조직을 24시간 수세한 후, 족근관절의 정중시상단면을 만들어 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 5µm의 박절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 면역조직화학적 관찰

실험종료일에 좌측 족근관절이 포함되도록 경골의 원위부에서 중족골 원위부사이를 적출하여 10%중성 포르마린 용액에 2일간 고정한 후, 10% EDTA 용액으로 2주간 탈회 하였다. 탈회된 조직의 족근관절의 정중시상단면을 만들어 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 5µm의 박절편 만들고 ABC kit(Vector Laboratories Inc., USA)를 이용하여 면역염색을 실시하였다. 1차 항체로서 monoclonal anti-m-calpain(Sigma Co., USA)을 1:50으로 희석하여 면역염색 chamber에서 12시간 이상 반응시키고, biotin이 표지된 2차 항체를 30분간 반응시킨 후, ABC reagent를 30분간 반응 시켜 염색한 후 DAB solution에 5분간 반응시켜 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 한 후, 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조염색으로는 염색과정 중 1차 항체 대신 normal

serum을 사용하여 비특이 염색여부를 확인하였다.

결 과

1. 병리조직학적 소견

실험 15일에 희생하여 얻은 족근관절의 병리조직학적 검사에서 정상군에서는 경골(tibia) 및 종골(central tarsal bone)의 관절연골 및 연골하 골조직, 관절낭, 관절강 등이 모두 정상적인 구조를 취하고 있었다.

대조군의 모든 예에서 강직성 골관절염(ankylosing osteoarthritis)의 소견이 관찰되었다. 활막은 현저한 염증세포의 침윤과 신생 조직의 증식으로 인하여 그 경계를 확인하기 어려울 정도로 현저히 비후되어 있었다. 활막의 증식성 비후는 관절강내로 침습하여 관절강을 가득 채울 정도로 전형적인 섬유성 판누스(fibrous pannus)를 형성하고 있었고, 대부분의 예에서 두 뼈 사이가 pannus에 의해서 연결되어 섬유성 강직증(fibrous ankylosis)을 초래하였다. 또한 관절연골(articular cartilage)의 대부분이 파괴되어 그 흔적만이 남아 있었으며 연골하 골조직(subchondral bony tissue)도 심하게 파괴되어 섬유성 육아조직으로 대체되어 있었다(Fig. 1).

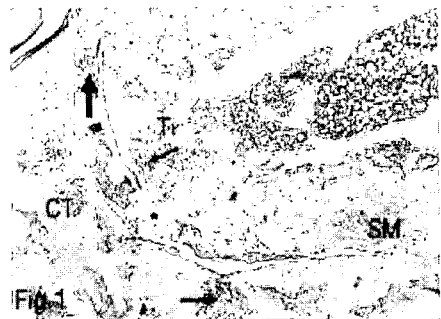


Fig. 1. Sagittal section of tarsal joint from control group. Inflamed synovial membrane(SM) and ingrowth of fibrous pannus(large arrow) to joint cavity(*), and destruction of subchondral bony tissue(small arrows) are evident.(stained with hematoxylin and eosin ; original magnification x 40)

처치군에서도 기본적인 병리조직학적 소견은 대조군에서와 같았으나, pannus에 의한 두뼈사이의 연결 정도, 관절연골의 파괴정도, 골조직의 파괴 정도는 대조군에 비해서 다소 완화 되어 있었다.

2. 면역조직화학적 소견

1차 항체로서 monoclonal anti-m-calpain 대신 normal serum을 사용하여 비특이 염색여부를 확인한 대조염색에서는 calpain 양성 반응이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

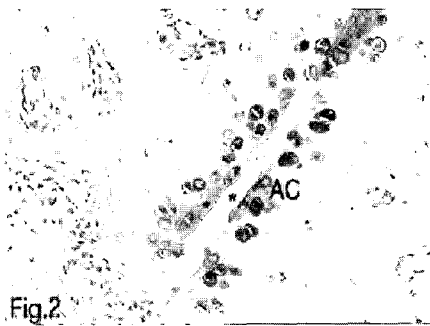


Fig. 2. Negative control section of tarsal joint from control group, incubated with normal serum instead of monoclonal anti-m-calpain. No positive reactions are appeared. AC ; articular cartilage, * ; joint cavity. (ABC stain, counter stained with hematoxylin, original magnification x 200)

정상군, 대조군 및 치료군의 모든 예에서 관절 주위의 골격근, 말초신경, 혈관벽 및 증식단계에 있는 관절연골의 연골소강(chondrocyte lacuna)에서 m-calpain 양성반응이 관찰되었으며(Fig. 3), 정상군의 모든 예에서 관절표면이나 활막 등 기타의 조직에서는 양성반응이 관찰되지 않았다.

대조군 및 처치군에서는 염증성으로 증식비후된 활막상피층 및 활막하 간질(Fig. 4), 관절연골의 표면 및 섬유성 pannus(Fig. 5) 등에서 양성반응이 관찰되었으며, 활막내 침윤된 염증세포 및 파괴된 연골하 골



Fig. 3. Positive control section of tarsal joint from normal group, incubated with monoclonal anti-m-calpain. Positive reactions(arrows) are appeared in growing articular cartilage. * ; joint cavity. (ABC stain, counter stained with hematoxylin, original magnification x 200)

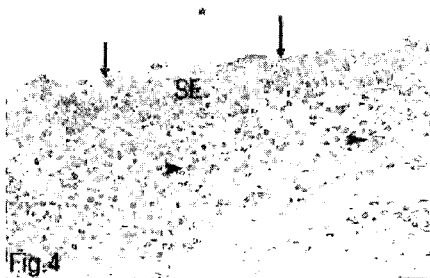


Fig. 4. Section of tarsal joint from control group, hyperplastic synovial epithelia(arrows) and subsynovial stroma cells(arrow heads) express calpain strongly. * ; joint cavity. (ABC stain, counter stained with hematoxylin, original magnification x 200)

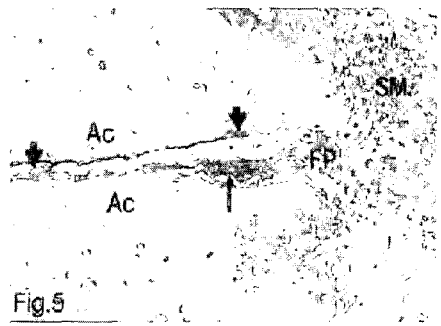


Fig. 5. Section of tarsal joint from control group, surface of articular cartilage(thick arrows) and ingrowing fibrous pannus(thin arrow) express calpain strongly. Ac ; articular cartilage, FP ; fibrous pannus, SM ; inflamed synovial membrane. (ABC stain, counter stained with hematoxylin, original magnification x 200)

조직 주위에 침윤된 섬유성 pannus(Fig. 6) 등에서도 다양한 정도의 양성반응이 확인되었다.

활막상피층 및 활막하 간질에서의 양성반응의 정도는 대조군 과 처치군에서 유사한 정도로 관찰되었으나, 관절연골의 표면에서의 양성반응은 대조군의 모든 예에서 ++ 이상의 양성반응이 나타났으나, 처치군에서는 6예 중 1예에서 +의 양성반응이, 6예 중 2예에서 음성반응이 관찰되었다. 파괴된 연골하 골조직 주위에 증식된 섬유성 pannus에서의 양성반응도 대조군에 비해서 처치군에서 현저히 감소되어 관찰

되었다. 대조군 및 처치군에서 관찰된 calpain 양성반응의 위치 및 발현 정도를 Table 1에 요약하였다.

고 찰

류마트성 관절염(rheumatoid arthritis)의 병태모델로서는 collagen-induced arthritis(CIA), adjuvant-induced arthritis(AIA), Avidine-induced arthritis, pristane-induced arthritis, oil-induced arthritis, endotoxin-induced arthritis 등 많은 방법이 알려져 있다^{6,15}. 각 관절염 모델은 각기의 장점과 단점을 지니고 있지만, CIA는 양측성으로 말단 관절염이 발생되고, 지속적인 관절의 염증과, 관절낭의 과증생(hyperplasia), 염증세포의 침윤, 관절연골의 미란, rheumatoid factor와 anticollagen의 존재, MHC와 비 MHC 유전자에 의한 유전적 조절, rheumatoid arthritis 약물에 대해 반응하는 등 사람의 류마트성 관절염과 매우 유사하여^{6,15,16}, 실험기간이 다소 길다는 단점에도 불구하고 많은 연구자가 류마트성 관절염의 동물 모델로서 이용하고 있다. 본 연구에서 관찰된 CIA의 병리조직학적 소견도 대부분의 다른 연구자의 소견^{16,17}과 유사하였으며, 사람의 류마트성 관절염의 소견^{1,2}과도 매우 흡사하여 CIA가 류마트성 관절염의 매우 적절한 모델임을 확인할 수 있었다.

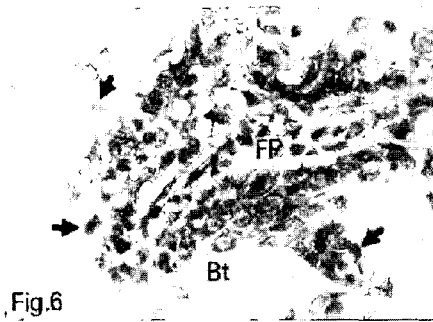


Fig. 6. Section of tarsal joint from control group, cells(arrows) in ingrowing fibrous pannus(FP) to subchondral bony tissue(Bt) express calpain strongly. (ABC stain, counter stained with hematoxylin, original magnification x 400)

Table 1. Expression of Calpain in Tibiotarsal Joints of Rats in CAS-Treated and Control Group at 15 days after Treatment

Group	Identification Number	hyperplastic synovial lining layer	stroma of synovium	surface of articular cartilage	fibrous pannus
Control	C1	+++	+++	+++	+++
	C2	++	++	+++	+++
	C3	+++	+++	+++	+++
	C4	++	++	++	++
	C5	++	++	++	++
	C6	+++	+++	+++	++
CAS-Treated	T1	++	++	-	++
	T2	++	++	+	+
	T3	++	+	++	++
	T4	++	+++	++	++
	T5	+++	+++	++	+
	T6	+	+	-	+

- : not observed, + : weak positive, ++ : moderate positive, +++ : strong positive
 Control : Immunization with collagen and distilled water treated group
 CAS-Treated : Immunization with collagen and *Cortex Acanthopanax Senticosi* treated group

인체의 류마트성 관절염 및 CIA를 통한 연구를 기초로 하여 현재 류마트성 관절염은 유전적 감수성을 지닌 개체가 미생물 항원에 폭로됨으로서 자가면역 반응이 개시되어 발생하는 것으로 이해되고 있다. 특히 제2형 collagen에 대한 항체의 생성 및 IgG의 Fc에 대한 항체의 형성으로 야기되는 자가면역반응이 중심적인 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다¹²⁾. 이 관절염의 초기에는 자가면역반응에 따른 cytokine의 작용으로 인한 비화농성 증식성 활막염이 유발되나 진행되면서 섬유성 pannus의 형성, 관절연골의 손상 및 관절연골간의 섬유성 연결 등으로 인하여 관절강직증이 초래된다. 이러한 병의 진행과정에 있어서, 관절강내에 침윤된 백혈구에서 유리하는 IL-1, TNF- α , IL-2, IL-6 등의 cytokine 등과 함께 여러 가지 단백질 분해효소 등의 작용이 주요하게 작용하는 것으로 알려져 있다¹³⁾.

또한 최근에는 류마트성 관절염에 있어서 침윤된 백혈구 또는 연골세포 및 활막세포 등에서 calpain의 분비증가가 확인되어 류마트성 관절염에서 관절연골의 손상이 calpain과 관련됨이 시사되었고¹³⁾, 또한 생쥐의 CIA 모델에서도 calpain의 발현이 증가되어 류마트성 관절염의 병리발생에서 calpain이 주요한 작용을 하리라 생각되어 왔다¹³⁾.

Calpain은 calcium-dependnt cysteine proteinase로 세포 단백질대사의 조절 인자로서 특히 혈소판 응집, 허혈성 세포손상 및 퇴행성 질환 등에서의 칼슘 항상성 및 단백질 대사에 변동이 생겼을 시 주요 조절인자로 알려져 있으며, 흰쥐에서는 골격근, 신장, 간장, 비장 등에서 관찰되어진다^{18,19)}.

필자 등의 선행 연구에서 가시오가피가 CIA에 있어서 TNF- α 및 IL-1 β 의 분비를 감소시켜 강직성 골관절염의 진행을 억제한 것으로 나타났다¹⁴⁾. 본 연구에서 calpain은 정상군, 대조군, 치료군의 모든 예에서 증식단계의 관절연골, 골격근 등에서 양성반응이 확인되었으며 이러한 소견은 흰쥐에서 calpain 분포를 관찰한 Yoshimura 등¹⁹⁾의 소견과 일치되는 것이다. 본 연구에서 정상적으로 calpain이 관찰되는 조직 외에 증식된 활막상피세포, 활막하 간질세포, 연골세포의

표면, 섬유성 pannus 등에서 양성반응이 확인되었다. 흰쥐의 CIA에서의 calpain에 대한 기존 연구가 없기에, 필자가 확인한 정도에서는, 다른 연구자의 결과와 비교할 수는 없지만, 생쥐의 CIA에서 calpain의 발현을 관찰한 Fujimori 등¹³⁾의 연구에서의 소견과 매우 유사하며, 병리조직학적인 강직성 골관절염의 정도와 관련되어 calpain 양성반응이 확인되었기에 흰쥐의 CIA 병리발생에서도 calpain은 일정한 역할을 하리라 생각된다.

본 연구에서 가시오가피를 투여한 처치군에서의 calpain 양성반응의 정도는 활막상피세포 및 활막하 간질조직에서는 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나, 관절연골의 표면에서의 양성반응 및 파괴된 연골하 골조직 주위에 증식된 섬유성 pannus에서의 양성반응은 대조군에 비해서 뚜렷하게 감소되어 관찰되었다. 가시오가피의 calpain 발현억제 효과가 어떤 기전으로 발생되었는지는 알 수 없지만, 류마트성 관절염에서 연골 및 골조직의 파괴와 관련되는 대부분의 분해효소들이 TNF- α 및 IL-1에 의해서 증진된다는 기존의 연구¹²⁾ 및 가시오가피가 CIA에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 분비감소를 초래한다는 결과¹⁴⁾를 종합할 때, 가시오가피를 투여한 처치군에서의 calpain의 발현억제 효과는 TNF α 및 IL-1감소와 밀접한 관련성이 있으리라 추측된다.

결론

흰쥐의 collagen-induced arthritis의 병리발생에 calpain이 관여하는지를 확인하고, 가시오가피 투여가 관절염이 발생한 관절조직내에서의 calpain의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해서 면역조직화학적 방법으로 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

정상군, 대조군 및 처치군 모두에서 calpain은 증식단계의 연골조직의 연골세포소강(chondrocyte lacunae), 골격근, 말초신경, 혈관벽에서 정상적으로 발현되었다.

처치군에서의 calpain 양성반응의 정도는 활막상피

세포 및 활막하 간질조직에서는 대조군과 유사한 정도로 발견되었으나, 관절연골의 표면에서의 양성반응 및 파괴된 연골하 골조직 주위에 증식된 섬유성 pannus에서의 양성반응은 대조군에 비해서 뚜렷하게 감소되어 발견되었다.

이상의 관찰결과로 미루어 흰쥐의 collagen-induced arthritis의 병리발생에 calpain이 일정정도 관련되며, 가시오가피의 투여는 관절조직내 calpain의 발현을 감소시켜 관절염의 진행을 억제하였으리라 사료된다.

참고문헌

1. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001;358:903-11.
2. Rosenberg AE. Skeletal system and soft tissue tumors. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. *Robbins pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia:W.B. Saunders. 1994:1249-53.
3. Olier WE, MacGregor A. Genetic epidemiology of rheumatoid disease. *Br J Rheumatol*. 1995;51:267-85.
4. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;36:1071-9.
5. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J Experimental Medicine*. 1977;146:857-68.
6. Socoloff L. Animal models of rheumatoid arthritis. *Int Rev Exp Pathol*. 1984;26:107-45.
7. Takeshita M, Sugita T, Takata I. Pathological evaluation of effect of anti-rheumatic drugs on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Exp Anim*. 1997;46(2):165-9.
8. Wang LR, Ishiguro N, Yamada E, Nishida Y, Sato K, Iwata H. The effect of da-fang-feng-tang on treatment of type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Am J Chin Med*. 1999;27(2):205-15.
9. Evanson JM, Feffrey JJ, Krane SM. Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J Clin Invest*. 1968;47:2639-51.
10. Hasty KA, Rdife RA, Kang AH, Stuart JM. The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:388-97.
11. Trabande A, Gray RE, Fassbender HG, Gay S. Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34:1444-51.
12. Yamamoto S, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, Yamamuro T. Calcium-dependent cysteine proteinase(calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum*. 1992;35:1309-17.
13. Fujimori Y, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, Yamamoto S, Yamamuro T. Immunohistochemical demonstration of calcium-dependnt cysteine proteinase(calpain) in collagen-induced arthritis in mice. *Z Rheumatol*. 1994;53(2):72-5
14. 박원태, 김순중, 서일복. 가시오가피가 흰쥐의 collagen 유발 관절염에 미치는 영향. *한방재활의학과 학회지*. 2002;12(1):85-99.
15. Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E, Guy M. Animal models of arthritis: Relevance to human disease. 1999;27:134-42.
16. Smith RJ, Sly LM. Type II collagen-induced arthritis in the diabetic-resistant biobreeding rat: Inflammatory and histopahtological features of joint pathology and effects of antiinflammatory and antirheumatic drugs on this chronic arthritic process. 1996;277:1801-13.
17. Takeshita M, Sugita T, Takata I. Pahtological evaluation of effect of anti-rheumatic drugs on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. 1997;46:165-9.
18. Murachi T. Calpain and calpastatin. 1983;8:167-9.
19. Yoshimura N, Ohtuki H, Hamkkubo T, Kitahara A, Kannagi R, Murachi T. Distribution of calpain in various organs of the rat: an immunohistochemical study. *Biomed Res*. 1984;5:419-24.