

# 定痛湯이 콜라겐으로 유도한 관절염 동물 병태 모델에 미치는 효과

조종철 · 구영선 · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 대전대학교 한의과대학 내과학교실

## Suppressive Effects of JTT on Collagen-Induced Arthritis in Mice

Jong Cheol Cho, Young Sun Koo<sup>1</sup>, Dong Hee Kim\*

Department of Pathology, 1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease involving multiple joint. In order to access the suppressive effects of JTT on rheumatoid arthritis and its effects on immune system we investigated whether JTT could suppress the disease progression of collagen-induced arthritis. DBA/1 mice were immunized with bovine type II collagen. After a second collagen immunization, mice were treated with DW, JTT (200 or 400 mg/Kg) or methotrexate (MTX, 30 mg/Kg) as a positive control. Oral administration of JTT significantly suppressed the progression of CIA, which extend is comparable to that of MTX. Histological examination revealed that JTT inhibited infiltration of inflammatory cells into affected paw joint and bone erosion and cartilage destruction were greatly reduced compared with control. Total cell number of spleen, lymph node and peripheral blood were significantly reduced. The absolute number of CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> cell in spleen from JTT treated mice were significantly decreased. The absolute number of CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, CD49b, CD3/CD49b cells in draining lymph node were significantly increased compared with control. In peripheral blood mononuclear cells of JTT treated mice, the absolute number of CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> cells were significantly decreased compared with control, while that of CD49b<sup>+</sup> was slightly increased. Infiltration of CD3<sup>+</sup> cells and CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells into paw joint was significantly reduced in JTT treated mice. The levels of pathologic cytokines including TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum were significantly decreased by oral treatment with JTT. The levels of IFN- $\gamma$  in the culture supernatant of splenocyte stimulated with CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> or collagen were dramatically decreased, while the levels of IL-4 was increased under CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> or collagen stimulation. Rheumatoid factors including IgG, IgM and collagen specific antibody were present much lower in the serum of JTT treated mice than control. Taken together, JTT has suppressive effects on rheumatoid arthritis by modulating immune system, and has potential to use anti-rheumatic arthritic agent in human.

Key words : Rheumatoid arthritis, autoimmune disease, JTT, spleen, lymph node, peripheral blood

### 서 론

류마티오이드 관절염 (Rheumatoid arthritis, RA)은 여러 관절에 염증을 유발하는 자가 면역성 질환이다. 활막세포 (sinoviocytes)의 활성화로 인한 만성적인 염증이 지속되어 판누스 (pannus)를 형성하며, 이들은 비가역적인 연골과 관절의 파괴를 유발하게 된다<sup>1,2)</sup>. 이들 질환의 진행 과정에서 T 세포 및 B 세

포와 같은 임파구와 염증성 세포들을 포함하는 백혈구의 활성화와 이들의 관절로의 유입이 매우 중요한 역할을 한다. B 세포는 류마티오이드 factor로 알려진 IgM과 IgG를 분비하여 관절염의 면역 반응을 활성화하는데<sup>3-5)</sup>, 활막의 염증이 생긴 부위에 드물게 존재하거나 환자에 따라서 존재하는 세포의 수에 변화가 다양한 것에 비해 CD4<sup>+</sup> T 세포는 관절염이 발생된 염증성 활막에 우세하게 존재하는 세포로서 질환의 개시와 진행을 위해 결정적인 역할을 한다<sup>6-9)</sup>. CD8<sup>+</sup> T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포처럼 우세하게 존재하지 않고 오히려 활막염이 존재하지 않는 다른 subregion에 존재하는 것으로 보고되었으나, 이 역시 germinal center를 형성함

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2007/01/10 · 수정 : 2007/01/24 · 채택 : 2007/02/01

으로서 관절염의 발생에 기여한다<sup>10)</sup>. 유입된 T 세포들은 수지상 세포나 (den-dritic cell)나 대식세포 (macrophage)와 같은 항원 제시 세포 (Antigen-presenting cells APC)와 함께 존재하며, 서로간의 작용에 의하여 면역 반응을 시작하고, 계속하여 섬유아양 활막세포 (fibroblast-like synoviocytes), 내피 세포 (endothelial cells)들과 상호 작용함으로써 가장 병리적인 세포로서 질환의 진행에 기여한다고 알려졌다<sup>11-13)</sup>. 활성화된 활막세포는 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$ )을 생산하며 키모카인 (chemokine)과 조직을 파괴하는 효소들을 분비하고 증식한다<sup>14-16)</sup>. 활막의 과도한 증식에 의해 관누스가 형성되고 연골과 뼈를 침범하여 결국에는 관절의 형태적 변형과 파괴를 초래한다. 또한 T 세포에 생존 신호 (survival signal)을 제공함으로써 침범을 받은 관절에 만성적 염증 상태를 유지하도록 한다<sup>17)</sup>.

韓醫學에서 모든 關節炎은 痺證의 範疇에 속한다고 볼 수 있다. 歷代 文獻에 나타난 “風濕” “歷節” “白虎歷節” “痛風” “身痛” 등은 모두 痺證의 範疇에 속하며, 류마토이드 관절염 역시 既存의 많은 論文에서 “歷節” “白虎歷節” “痛風”의 範疇로 記述<sup>18-20)</sup>한 바가 있다.

本 試料인 定痛湯은 13종의 藥物로 構成된 處方으로 黃柏, 梔子, 防己, 車前草 등의 清熱利濕之劑를 중심으로 多様な 藥物이 加味되어 臨床에서 痛症이 심한 實證性 關節炎에 活用되고 있다.

특히 構成 藥物中 黃柏은 lipopolysaccharide 誘發 關節炎에서 IL-1 $\beta$  發顯을 抑制함이 報告<sup>21)</sup>되었고, 車前草는 消炎, 鎮痛 作用<sup>22)</sup>이, 防己는 關節炎 誘發 因子에 대한 抑制 效能<sup>23)</sup>이, 木通은 關節滑液膜內 cytokine과 prostaglandin E2 抑制 效能<sup>24)</sup>이, 全蝎은 microcrystalline sodium urate로 誘發된 痛風 抑制 效能<sup>25)</sup>이 이미 實驗的으로 糾明된 바가 있어, 本 試料의 류마토이드 關節炎에 대한 有意性있는 結果가 期待된다.

이에 本 實驗에서는 보다 有意性있는 關節炎 治療劑 開發과 더불어 臨床 活用 處方의 客觀的 效能 糾明을 위하여, 定痛湯 (JTT)을 試料로 콜라겐으로 關節炎을 誘發한(CIA) 動物 病態 모델에서의 臨床 症狀, 血液과 組織內의 免疫細胞, 사이토카인 및 組織學的 變化 등을 檢索하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험 동물은 플라스인터내셔널 (England)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2°C, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 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) 약재

본 실험에 사용한 定痛湯 (JTT)의 구성 약물은 대전대학교

부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩 (貼)의 내용과 분량은 아래와 같다.

Table 1. The Composition of Jeongtong-tang

韓藥名	生藥名	(g)
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	8
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	8
車前草	<i>Plantaginis Herba</i>	8
漢防己	<i>Cocculi, Stephaniae Radix</i>	8
木瓜	<i>Chaenomelis Fructus</i>	8
秦艽	<i>Gentianae Macrophyllae</i>	8
昆布	<i>Thallus Laminariae</i>	8
海藻	<i>Thallus Sargassi</i>	8
檳榔	<i>Arecae Pericarpium</i>	8
木通	<i>Akebiae Lignum</i>	3
全蝎	<i>Buthus</i>	1.5
白殭蠶	<i>Batryticatus Bombycis</i>	5
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	10
Total amount		91.5

### 3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, TMB, antibody biotin- conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxyme thoxyphenyl- 2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A), 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, IL-4와 IFN- $\gamma$  는 ELISA (R&D system, U.S.A) kit, antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system, U.S.A), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 재조합 TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$ 는 R&D system 사 (Minneapolis, U.S.A) 제품을, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b는 Pharmingen 사 (Torreyana, Iraq) 제품을, anti-CD28, anti-CD3은 (Serotec, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), Microwave oven (LG, Korea), Real Time Quantitative RT-PCR (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), spectrophotometer (Shimadzu, Japan),

centrifuge (Centrikon, Sigma), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), turbo thermal-cycler TM (Bioneer Co., Korea), heating block, ice-maker (Vision, Korea), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001, Korea), vaccum pump, rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), Freeze dryer (EYELA FDu-540, Japan), autoclave (Hirayama, Japan), imager system (Kodak, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ELISA reader (molecular devices, U.S.A), cell strainer (FALCON, U.S.A), 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

JTT 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출 장치 (Rotary evaporator, BuCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDu-540, Japan)를 이용하여 완전 건조 (19.6 g) 한 후, 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 류마티스 관절염 생쥐 (CIA) 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/1J 생쥐 6마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate (0.3 mg/kg) 처리한 양성대조군과 JTT 투여군으로 나누었다.

Severity of Arthritis in the metatarsophalangeal.

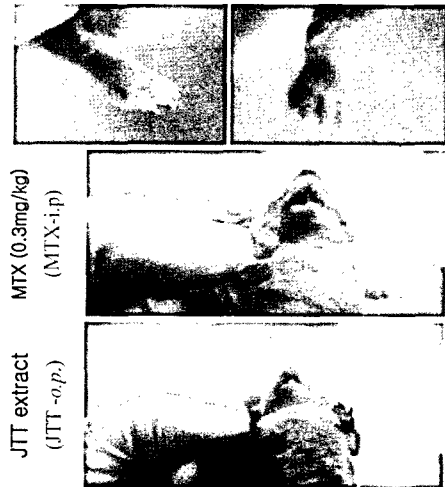


Fig. 1. Establishment of collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1J mice. Collagen-induced arthritis (CIA) was induced by subcutaneous injection of with 200 µg of bovine type II collagen, suspended in 0.01 mol/L acetic acid and emulsified in complete Freund's adjuvant in DBA/1J mice (7-week old, male). A booster injection of 200 µg of bovine type II collagen was performed at three weeks after the initial injection. The mice were divided into 4 groups and orally administrated with DW, JTT or MTX as a positive control for 21 days.

3) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 6 마리를 한 군으로 하여 정상군 (WT), 치료제를 처리하지 않은 대조군(Control-CT), 그리고 methotrexate (0.3 mg/kg) 처리군, JTT 처리군으로 나누어 booster 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)는 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 매일 복강에 주사하였으며, JTT (400, 200 mg/kg) 처리군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) Spleen, draining lymph node (DLN), joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 spleen, draining lymph node (DLN), joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 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℃ shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

5) 형광 유세포 분석

DBA/1J 생쥐에서 spleen, draining lymph node (DLN), joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37℃ shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 spleen, draining lymph node (DLN), joint에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

PBMC (peripheral blood mononucleo cell)는 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3g NH<sub>4</sub>Cl, 1g KHCO<sub>3</sub>, in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 PBMC 세포를 5 x 10<sup>5</sup>/ml 세포로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석하였다.

6) 비장세포내 IL-4, IFN-γ 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 ( $2 \times 10^6$ /mL)는 anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) 항체 (Serotec, U.S.A)와 anti-CD3 (Serotec, U.S.A 1  $\mu$ g/mL), 그리고 collagen type II (1  $\mu$ g/mL)로 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass)에서 coating 된 plate에서 48 시간 동안 동시배양 하였다. 비장내 IL-4와 IFN- $\gamma$ 는 ELISA (R&D system, U.S.A) kit를 이용하여 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 비장세포 배양 상층액 100  $\mu$ l씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin- HRP conjugated (R&D system, U.S.A) 100  $\mu$ l를 처리하고, 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 혈청내 사이토카인 및 Rheumatoid factor (RF) 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자 방법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  그리고 RF인 총 IgG와 IgM 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100  $\mu$ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생산량을 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100  $\mu$ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$  standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. Spleen, DLN 및 paw joint의 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 8주간 JTT를 경구 투여한 후 spleen, DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, spleen에서는

정상군이  $9.1 \pm 1.1 (x10^7)$ , 대조군이  $17.2 \pm 1.0 (x10^7)$ , MTX 투여군이  $15.2 \pm 1.8 (x10^7)$ , JTT 400 mg/kg 투여군이  $9.2 \pm 0.4 (x10^7)$ , JTT 200 mg/kg 투여군이  $10.3 \pm 0.7 (x10^7)$ 로 나타나 400, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*\*) p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

DLN에서는 정상군이  $43.8 \pm 18.6 (x10^6)$ , 대조군이  $7.6 \pm 3.2 (x10^6)$ , MTX 투여군이  $54.3 \pm 3.6 (x10^6)$ , JTT 400 mg/kg 투여군이  $2.7 \pm 4.4 (x10^6)$ , JTT 200 mg/kg 투여군이  $12.3 \pm 2.1 (x10^6)$ 로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 2).

Paw joint에서는 정상군이  $30.3 \pm 1.2 (x10^6)$ , 대조군이  $114.0 \pm 1.8 (x10^6)$ , MTX 투여군이  $69.7 \pm 4.9 (x10^6)$ , JTT 400 mg/kg 투여군이  $80.4 \pm 4.2 (x10^6)$ , JTT 200 mg/kg 투여군이  $66.2 \pm 13.4 (x10^6)$ 로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Effect of JTT Extract on Total Cell Number of Collagen-induced Arthritis (CIA) in DBA/1J Mice

	Sample	Total cell NO.
Spleen ( $x10^7$ )	Normal	9.1 $\pm$ 1.1
	Control	17.2 $\pm$ 1.0
	MTX	15.2 $\pm$ 1.8
	JTT 400 mg/kg	9.2 $\pm$ 0.4***
	JTT 200 mg/kg	10.3 $\pm$ 0.7***
DLN ( $x10^6$ )	Normal	43.8 $\pm$ 18.6
	Control	7.6 $\pm$ 3.2
	MTX	54.3 $\pm$ 3.6
	JTT 400 mg/kg	2.7 $\pm$ 4.4**
	JTT 200 mg/kg	12.3 $\pm$ 2.1***
Paw joint ( $x10^6$ )	Normal	30.3 $\pm$ 1.2
	Control	114.0 $\pm$ 1.8
	MTX	69.70 $\pm$ 4.9
	JTT 400 mg/kg	80.4 $\pm$ 4.2**
	JTT 200 mg/kg	66.2 $\pm$ 13.4**

2. 면역세포에 미치는 영향

1) 비장내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19 $^+$  발현에 미치는 영향

비장내 CD19 $^+$  세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이  $43.2 \pm 8.9 (x10^6)$ , 대조군이  $118.4 \pm 5.9 (x10^6)$ , MTX 투여군이  $81.4 \pm 8.9 (x10^6)$ , JTT 400 mg/kg 투여군이  $40.7 \pm 5.8 (x10^6)$ , JTT 200 mg/kg 투여군이  $52.9 \pm 3.6 (x10^6)$ 로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*\*)p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

(2) CD3 $^+$  발현에 미치는 영향

비장내 CD3 $^+$  세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이  $37.4 \pm 2.9 (x10^6)$ , 대조군이  $44.2 \pm 2.2 (x10^6)$ , MTX 투여군이  $52.9 \pm 3.1 (x10^6)$ , JTT 400 mg/kg 투여군이  $42.6 \pm 1.7 (x10^6)$ , JTT 200 mg/kg 투여군이  $42.4 \pm 3.2 (x10^6)$ 로 나타났다 (Table 3).

(3) CD3 $^+$ /CD69 $^+$  발현에 미치는 영향

비장내 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 4.5 ± 0.0 (x10<sup>6</sup>), 대조군이 23.5 ± 1.5 (x10<sup>6</sup>), MTX 투여군이 4.7 ± 1.3 (x10<sup>6</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 4.2 ± 0.0 (x10<sup>6</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 5.8 ± 1.3 (x10<sup>6</sup>)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

(4) CD4<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

비장내 CD4<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 20.5 ± 2.4 (x10<sup>6</sup>), 대조군이 21.8 ± 4.4 (x10<sup>6</sup>), MTX 투여군이 30.6 ± 3.1 (x10<sup>6</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 21.1 ± 0.8 (x10<sup>6</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 23.7 ± 3.5 (x10<sup>6</sup>)로 나타났다(Table 3).

(5) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

비장내 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 0.6 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>), 대조군이 4.8 ± 0.3 (x10<sup>6</sup>), MTX 투여군이 1.7 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 1.8 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 1.9 ± 0.0 (x10<sup>6</sup>)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

(6) CD8<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

비장내 CD8<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 1.6 ± 0.3 (x10<sup>6</sup>), 대조군이 2.2 ± 0.3 (x10<sup>6</sup>), MTX 투여군이 2.2 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 1.5 ± 0.1 (x10<sup>6</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 1.8 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>)로 나타났다(Table 3).

(7) CD49b<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

비장내 CD49b<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 5.7 ± 0.4 (x10<sup>6</sup>), 대조군이 5.9 ± 0.8 (x10<sup>6</sup>), MTX 투여군이 8.7 ± 0.8 (x10<sup>6</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 4.3 ± 0.2 (x10<sup>6</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 4.7 ± 0.1 (x10<sup>6</sup>)로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of JTT Extract on Spleen Cell Absolute Number of Collagen-induced Arthritis (CIA) in DBA/1J Mice

	Sample	Total cell NO.
CD19 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal	43.2 ± 8.9
	Control	118.4 ± 5.9
	MTX	81.4 ± 8.9
	JTT 400 mg/kg	40.7 ± 5.8***
	JTT 200 mg/kg	52.9 ± 3.6***
	CD3 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal
Control		44.2 ± 2.2
MTX		52.9 ± 3.1
JTT 400 mg/kg		42.6 ± 1.7
JTT 200 mg/kg		42.4 ± 3.2
CD3 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )		Normal
	Control	23.5 ± 1.5
	MTX	4.7 ± 1.3
	JTT 400 mg/kg	4.2 ± 0.0***
	JTT 200 mg/kg	5.8 ± 1.3***
	CD4 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal
Control		21.8 ± 4.4
MTX		30.6 ± 3.1
JTT 400 mg/kg		21.1 ± 0.8
JTT 200 mg/kg		23.7 ± 3.5

CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal	0.6 ± 0.2
	Control	4.8 ± 0.3
	MTX	1.7 ± 0.2
	JTT 400 mg/kg	1.8 ± 0.2***
	JTT 200 mg/kg	1.9 ± 0.0***
CD8 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal	1.6 ± 0.3
	Control	2.2 ± 0.3
	MTX	2.2 ± 0.2
	JTT 400 mg/kg	1.5 ± 0.1
	JTT 200 mg/kg	1.8 ± 0.2
CD49b <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Normal	5.7 ± 0.4
	Control	5.9 ± 0.8
	MTX	8.7 ± 0.8
	JTT 400 mg/kg	4.3 ± 0.2
	JTT 200 mg/kg	4.7 ± 0.1

2) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD19<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 105.3 ± 3.2 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 35.3 ± 1.5 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 102.0 ± 6.7 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 56.0 ± 1.2 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 64.0 ± 3.3 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(2) CD3<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 311.5 ± 4.7 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 36.6 ± 5.1 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 407.2 ± 2.1 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 188.8 ± 3.9 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 260.8 ± 8.4 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(3) CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 211.7 ± 9.4 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 52.0 ± 2.1 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 340.4 ± 2.2 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 159.8 ± 2.9 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 236.8 ± 8.6 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01, \*p<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(4) CD4<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 223.2 ± 10.7 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 25.1 ± 7.9 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 273.6 ± 2.8 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 136.5 ± 2.2 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 177.3 ± 5.7 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*p<0.05) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(5) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 29.3 ± 1.1 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 6.5 ± 2.6 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 31.1 ± 1.8 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 16.8 ± 1.3 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 22.0 ± 2.8 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 증

가 효과를 나타내었다(Table 4).

(6) CD8<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD8<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 93.4 ± 4.5 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 10.9 ± 6.3 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 138.3 ± 9.4 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 56.5 ± 1.5 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 89.2 ± 2.5 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(7) CD49b<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD49b<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 71.8 ± 3.3 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 9.6 ± 2.5 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 60.2 ± 2.5 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 41.2 ± 1.2 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 62.8 ± 3.5 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*\*p<0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

(8) CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 153.0 ± 9.1 (x10<sup>4</sup>), 대조군이 16.9 ± 1.4 (x10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 282.4 ± 1.8 (x10<sup>4</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 122.7 ± 2.2 (x10<sup>4</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 174.2 ± 8.1 (x10<sup>4</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*\*p<0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 4).

Table 4. Effect of JTT Extract on DLN Cell Absolute Number of Collagen-induced Arthritis (CIA) in DBA/1J Mice.

	Sample	Total cell NO.
CD19 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	105.3 ± 3.2
	Control	35.3 ± 1.5
	MTX	102.0 ± 6.7
	JTT 400 mg/kg	56.0 ± 1.2***
	JTT 200 mg/kg	64.0 ± 3.3***
CD3 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	311.5 ± 4.7
	Control	36.6 ± 5.1
	MTX	407.2 ± 2.1
	JTT 200 mg/kg	260.8 ± 8.4***
CD3 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	211.7 ± 9.4
	Control	52.0 ± 2.1
	MTX	340.4 ± 2.2
	JTT 400 mg/kg	159.8 ± 2.9**
	JTT 200 mg/kg	236.8 ± 8.6*
CD4 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	223.2 ± 10.7
	Control	25.1 ± 7.9
	MTX	273.6 ± 2.8
	JTT 200 mg/kg	177.3 ± 5.7*
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	29.3 ± 1.1
	Control	6.5 ± 2.6
	MTX	31.1 ± 1.8
	JTT 200 mg/kg	22.0 ± 2.8
CD8 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	93.4 ± 4.5
	Control	10.9 ± 6.3
	MTX	138.3 ± 9.4
	JTT 200 mg/kg	89.2 ± 2.5**

CD49b <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	71.8 ± 3.3
	Control	9.6 ± 2.5
	MTX	60.2 ± 2.5
	JTT 200 mg/kg	62.8 ± 3.5***
CD3 <sup>+</sup> /CD49b <sup>+</sup>	Normal	153.0 ± 9.1
	Control	16.9 ± 1.4
	MTX	282.4 ± 1.8
	JTT 200 mg/kg	174.2 ± 8.1***

3) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 12.3 ± 3.2 (x10<sup>5</sup>), 대조군이 137.8 ± 35.1 (x10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 53.6 ± 4.1 (x10<sup>5</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 52.4 ± 4.1 (x10<sup>5</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 59.9 ± 8.2 (x10<sup>5</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5)

(2) CD11<sup>b</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 3.5 ± 0.5 (x10<sup>5</sup>), 대조군이 183.0 ± 7.1 (x10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 35.7 ± 7.5 (x10<sup>5</sup>), JTT 400 mg/kg 투여군이 43.3 ± 5.7 (x10<sup>5</sup>), JTT 200 mg/kg 투여군이 41.5 ± 3.5 (x10<sup>5</sup>)로 나타나, 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*\*p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effect of JTT Extract on Paw joint Cell Absolute Number of Collagen-induced Arthritis (CIA) in DBA/1J Mice.

	Sample	Total cell NO.
CD3 <sup>+</sup> (x10 <sup>5</sup> )	Normal	12.3 ± 3.2
	Control	137.8 ± 35.1
	MTX	53.6 ± 4.1
	JTT 200 mg/kg	59.9 ± 8.2**
CD11 <sup>b</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> (x10 <sup>5</sup> )	Normal	3.5 ± 0.5
	Control	183.0 ± 7.1
	MTX	35.7 ± 7.5
	JTT 200 mg/kg	41.5 ± 3.5***

4) PBMC 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD19<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 29.8 ± 0.1 (%), 대조군이 23.8 ± 1.6 (%), MTX 투여군이 22.7 ± 2.9 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 29.7 ± 1.3 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 22.6 ± 2.2 (%)로 나타났다(Table 6).

(2) CD3<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 60.3 ± 2.8 (%), 대조군이 69.4 ± 0.5 (%), MTX 투여군이 68.3 ± 0.7 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 60.2 ± 6.3 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 71.6 ± 2.0 (%)로 나타났다(Table 6).

(3) CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출

한 결과, 정상군이 8.3 ± 2.0 (%), 대조군이 37.4 ± 0.9 (%), MTX 투여군이 22.9 ± 1.0 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 13.7 ± 1.8 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 23.4 ± 2.8 (%)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

(4) CD4<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD4<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 45.2 ± 3.6 (%), 대조군이 65.9 ± 1.7 (%), MTX 투여군이 48.8 ± 0.4 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 43.9 ± 2.2 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 55.5 ± 1.8 (%)로 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 6).

(5) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 3.9 ± 0.9 (%), 대조군이 9.86 ± 0.8 (%), MTX 투여군이 6.9 ± 0.8 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 6.1 ± 0.4 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 7.5 ± 0.6 (%)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

(6) CD8<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD8<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 7.8 ± 0.1 (%), 대조군 8.2 ± 0.7 (%), MTX 투여군 10.1 ± 0.3 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 5.4 ± 0.5 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 9.8 ± 0.7 (%)로 나타나 400 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

(7) CD49b<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD49b<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 6.5 ± 0.6 (%), 대조군이 3.0 ± 0.1 (%), MTX 투여군이 5.4 ± 0.4 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 4.3 ± 0.6 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 4.5 ± 0.3 (%)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 6).

(8) CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 3.7 ± 0.9 (%), 대조군이 6.2 ± 0.2 (%), MTX 투여군이 5.4 ± 0.4 (%), JTT 400 mg/kg 투여군이 2.5 ± 0.3 (%), JTT 200 mg/kg 투여군이 3.6 ± 0.4 (%)로 나타났었다(Table 6).

Table 6. Effect of JTT Extract on PBMC Cell Absolute Number of Collagen-induced Arthritis (CIA) in DBA/1J Mice.

	Sample	% of PBMC
CD19 <sup>+</sup>	Normal	29.8 ± 0.1
	Control	23.8 ± 1.6
	MTX	22.7 ± 2.9
	JTT 400 mg/kg	29.7 ± 1.3
	JTT 200 mg/kg	22.6 ± 2.2
CD3 <sup>+</sup>	Normal	60.3 ± 2.8
	Control	69.4 ± 0.5
	MTX	68.3 ± 0.7
	JTT 400 mg/kg	60.2 ± 6.3
	JTT 200 mg/kg	71.6 ± 2.0

CD3 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	Normal	8.3 ± 2.0
	Control	37.4 ± 0.9
	MTX	22.9 ± 1.0
	JTT 400 mg/kg	13.7 ± 1.8**
	JTT 200 mg/kg	23.4 ± 2.8**
CD4 <sup>+</sup>	Normal	45.2 ± 3.6
	Control	65.9 ± 1.7
	MTX	48.8 ± 0.4
	JTT 400 mg/kg	43.9 ± 2.2
	JTT 200 mg/kg	55.5 ± 1.8
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	Normal	3.9 ± 0.9
	Control	9.9 ± 0.8
	MTX	6.9 ± 0.8
	JTT 400 mg/kg	6.1 ± 0.4***
	JTT 200 mg/kg	7.5 ± 0.6*
CD8 <sup>+</sup>	Normal	7.8 ± 0.1
	Control	8.2 ± 0.7
	MTX	10.1 ± 0.3
	JTT 400 mg/kg	5.4 ± 0.5*
	JTT 200 mg/kg	9.8 ± 0.7
CD49b <sup>+</sup>	Normal	6.5 ± 0.6
	Control	3.0 ± 0.1
	MTX	5.4 ± 0.4
	JTT 400 mg/kg	4.3 ± 0.6
	JTT 200 mg/kg	4.5 ± 0.3
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	Normal	3.7 ± 0.9
	Control	6.2 ± 0.2
	MTX	5.4 ± 0.4
	JTT 400 mg/kg	2.5 ± 0.3
	JTT 200 mg/kg	3.6 ± 0.4

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) 혈액내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군이 5.5 ± 0.4 (pg/ml), 대조군이 82.9 ± 4.5 (pg/ml), MTX 투여군이 19.2 ± 4.4 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 22.3 ± 1.0 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 21.5 ± 1.6 (pg/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

(2) TNF-α 생성량에 미치는 영향

TNF-α 생성량은 정상군이 41.2 ± 3.0 (pg/ml), 대조군이 165.8 ± 9.9 (pg/ml), MTX 투여군이 79.1 ± 1.8 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 101.4 ± 9.1 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 129.4 ± 31.9 (pg/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 7).

Table 7. Effects of JTT on the Levels of Cytokine in the Serum of CIA Mice

	Sample	pg/ml
IL-6	Normal	5.5 ± 0.4
	Control	82.9 ± 4.5
	MTX	19.2 ± 4.4
	JTT 400 mg/kg	22.3 ± 1.0***
	JTT 200 mg/kg	21.5 ± 1.6***
CD3 <sup>+</sup> (x10 <sup>4</sup> )	Normal	41.2 ± 3.0
	Control	165.8 ± 9.9
	MTX	79.1 ± 1.8
	JTT 400 mg/kg	101.4 ± 9.1***
	JTT 200 mg/kg	129.4 ± 31.9***

2) 비장세포 부유액내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IFN- $\gamma$  생성량에 미치는 영향

IFN- $\gamma$  생성량은 정상군이 396.3  $\pm$  2.6 (pg/ml), 대조군이 601.6  $\pm$  4.3 (pg/ml), MTX 투여군이 392.0  $\pm$  0.1 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 399.2  $\pm$  2.4 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 396.3  $\pm$  2.4 (pg/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 8).

(2) CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 920.9  $\pm$  14.7 (pg/ml), 대조군이 807.7  $\pm$  15.5 (pg/ml), MTX 투여군이 909.5  $\pm$  10.2 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 921.3  $\pm$  4.0 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 915.1  $\pm$  7.7 (pg/ml)로 나타나 400 mg/kg, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p <0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다 (Table 8).

(3) 콜라겐으로 활성화된 비장세포의 IFN- $\gamma$  생성량에 미치는 영향

IFN- $\gamma$  생성량은 정상군이 87.2  $\pm$  2.4 (pg/ml), 대조군이 570.5  $\pm$  6.7 (pg/ml), MTX 투여군이 69.2  $\pm$  3.0 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 105.6  $\pm$  1.2 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 86.6  $\pm$  4.8 (pg/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 8).

(4) 콜라겐으로 활성화된 비장세포의 IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 201.2  $\pm$  1.4 (pg/ml), 대조군이 42.6  $\pm$  2.5 (pg/ml), MTX 투여군이 100.8  $\pm$  2.1 (pg/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 66.1  $\pm$  4.8 (pg/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 90.3  $\pm$  4.3 (pg/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다 (Table 8).

Table 8. Effects of JTT on Cytokine Production in the Culture Supernatant of CD3/CD28-stimulated Splenocytes

Stimulated factor	Sample	pg/ml
CD3/CD28	Normal	396.3 $\pm$ 2.6
	Control	601.6 $\pm$ 4.3
	MTX	392.3 $\pm$ 2.6
	JTT 400 mg/kg	399.2 $\pm$ 2.4***
	JTT 200 mg/kg	396.3 $\pm$ 2.4***
	IFN- $\gamma$	
IL-4	Normal	920.9 $\pm$ 14.7
	Control	807.7 $\pm$ 15.5
	MTX	909.5 $\pm$ 10.2
	JTT 400 mg/kg	921.3 $\pm$ 4.0***
	JTT 200 mg/kg	915.1 $\pm$ 7.7***
	IFN- $\gamma$	
Collagen II	Normal	87.2 $\pm$ 2.4
	Control	570.5 $\pm$ 6.7
	MTX	69.2 $\pm$ 3.0
	JTT 400 mg/kg	105.6 $\pm$ 1.2***
	JTT 200 mg/kg	86.6 $\pm$ 4.8***
	IFN- $\gamma$	
IL-4	Normal	201.2 $\pm$ 1.4
	Control	42.6 $\pm$ 2.5
	MTX	100.8 $\pm$ 2.1
	JTT 400 mg/kg	66.1 $\pm$ 4.8***
	JTT 200 mg/kg	90.3 $\pm$ 4.3**
	IFN- $\gamma$	

5. Rheumatoid factor(RF)에 미치는 영향

1) IgG 혈중 농도에 미치는 영향

IgG 혈중 농도는 정상군이 4.7  $\pm$  0.5 (U/ml), 대조군이 54.8  $\pm$  2.5 (U/ml), MTX 투여군이 16.5  $\pm$  1.4 (U/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 24.5  $\pm$  2.6 (U/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 34.9  $\pm$  2.9 (U/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 9).

2) IgM 생성량에 미치는 영향

IgM 혈중 농도는 정상군이 72.1  $\pm$  7.3 (U/ml), 대조군이 141.0  $\pm$  1.8 (U/ml), MTX 투여군이 89.7  $\pm$  1.5 (U/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 88.7  $\pm$  5.5 (U/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 101.0  $\pm$  2.9 (U/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 9).

Table 9. Effects of JTT on Levels of Total IgG in the Serum of CIA Mice

	Sample	U/ml
IgG	Normal	4.7 $\pm$ 0.5
	Control	54.8 $\pm$ 2.5
	MTX	16.5 $\pm$ 1.4
	JTT 400 mg/kg	24.5 $\pm$ 2.6***
	JTT 200 mg/kg	34.9 $\pm$ 2.9***
IgM	Normal	72.1 $\pm$ 7.3
	Control	141.0 $\pm$ 1.8
	MTX	89.7 $\pm$ 1.5
	JTT 400 mg/kg	88.7 $\pm$ 5.5***
	JTT 200 mg/kg	101.0 $\pm$ 2.9***

6. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 514.0  $\pm$  68.7 (U/ml), 대조군이 14882.3  $\pm$  1513.6 (U/ml), MTX 투여군이 5484.0  $\pm$  256.7 (U/ml), JTT 400 mg/kg 투여군이 6995.0  $\pm$  1074.0 (U/ml), JTT 200 mg/kg 투여군이 9686.0  $\pm$  1073.6 (U/ml)로 나타나 400, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 (\*\*p <0.001, \*\*p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Table 10).

Table 10. Effects of JTT on Levels of Collagen II Specific Antibody in the Serum of CIA Mice

	Sample	U/ml
Collagen II	Normal	514.0 $\pm$ 68.7
	Control	14882.3 $\pm$ 1513.6
	MTX	5484.0 $\pm$ 256.7
	JTT 400 mg/kg	6995.0 $\pm$ 1074.0***
	JTT 200 mg/kg	9686.0 $\pm$ 1073.6**

고찰

韓醫學에서 모든關節炎은痺證의範疇에속한다고볼수있다.痺證이란風·寒·濕·熱邪氣가肌膚,經絡,筋骨,血脈에침입하여肌肉,筋骨부위에疝痛,腫脹,重着,麻木,變形등을誘發함으로써活動障礙를同伴하는證候를通稱한다<sup>18-20)</sup>.中國에서는1983년에“痺證”을“痺病”으로擴大解釋하였으며,現在에는“中醫風濕病”으로命名되어지기도한다<sup>18)</sup>.歷代文獻에나



타난 “風濕” “歷節” “白虎歷節” “痛風” “身痛” 등은 모두 痺證의 範疇에 속하며, 류마티스 關節炎 역시 既存의 많은 論文에서 “歷節” “白虎歷節” “痛風”의 範疇로 記述<sup>18-20)</sup>한 바가 있다.

韓醫學에서 最近 報告된 류마티스 關節炎에 대한 實驗的 研究는 多樣한 處方<sup>27-29)</sup>과 韓藥<sup>30)</sup>을 試料로 주로 免疫 調節 作用을 통한 항류마티스 效果 檢索이 主를 이룬다. 特히 痛症이 매우 極烈하고, 風·寒·濕 邪氣로 인하여 發生과 惡化가 이루어진다는 점에서 祛風寒濕之劑에 대한 研究가 先行되어지고 있다.

本 試料인 定痛湯 (JTT)은 現在 臨床에서 痛症이 심한 實驗性 關節炎에 活用되고 있는 處方으로, 清熱利濕之劑를 중심으로 多樣한 藥物이 加味되어 있다. 構成 藥物中 黃柏<sup>21)</sup>, 車前草<sup>22)</sup>, 防己<sup>23)</sup>, 木通<sup>24)</sup>, 全蝎<sup>25)</sup> 등은 이미 關節炎 機轉에 關與하는 多樣한 因子들에 대한 效能이 糾明된 바가 있다.

최근에 RA의 발병 및 진행에 있어서 다양한 면역 세포들의 역할이 밝혀지고 있으나 이들의 역할과 상호 작용은 복잡하다. 활성화된 T 세포의 면역 반응을 억제하기 위하여 몇몇 조절 T 세포가 활성화되는 것이 보고되었다. Collagen induced arthritis (CIA) 모델<sup>31)</sup>에서 CD25<sup>+</sup> 세포들을 제거하면 관절염의 진행이 빨라지고 심화되는<sup>32)</sup>, 반면 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell을 외부에서 주입해 주면 CIA가 치료되는 것을 관찰함으로써<sup>33)</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T (regulatory T cells) 세포가 염증이 발생한 관절에 존재하며 질환의 진행을 억제하는 세포군으로 제안되었다<sup>34)</sup>. 또한 CD49b<sup>+</sup> 조절 T 세포는 자가 항원 (alloantigen)에 감작된 미성숙 수지상 세포에 (iDC, immature dendritic cells)에 의해서 활성화되고 증식되는 세포로서 RA와 같은 자가 면역성 질환의 억제 작용을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>35)</sup>. CD69 분자는 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)을 항원으로 감작시켰을 때, 초기 활성화 과정에서 NK 세포나 T 세포에 그 발현이 증가되기 때문에 초기 활성화 마커로 사용될 수 있다<sup>36)</sup>. 관절염에서 CD69 활성화의 역할에 대하여는 명확하지 않으나<sup>37)</sup>, CD69가 발현되지 않는 CIA 관절염 생쥐에서는 관절염이 악화되는 것으로 보아 CD69의 존재가 자가 면역 질환의 억제 작용과 관련이 있는 것으로 제안되고 있다<sup>38)</sup>.

DBA/1J 생쥐에서 콜라겐으로 유도되는 관절염 (collagen-induced arthritis, CIA)은 사람의 류마티스 관절염과 유사한 과도한 면역 반응에 의하여 발생하므로 류마티스 관절염에 관한 약물의 효능을 연구하는데 가장 널리 사용되고 있다<sup>39)</sup>.

관절염 억제 작용과 연골 보호 작용이 면역 세포의 활성 조절에 의한 것인지를 조사하기 위하여 비장, 임파절, 말초 혈액에서 면역세포 수를 조사한 결과 CIA가 유도된 생쥐에서는 비장과 말초 혈액 중에는 총 면역세포 수가 증가한 반면 임파절 (DLN)에서는 그 수가 매우 감소한 것을 확인하였다 (Table 2). 반면 JTT의 투여군은 이러한 면역 세포의 불균형을 조절하여서 정상 쥐와 비슷한 세포수를 유지하는 것으로 나타났다 (Table 2). 비장에서는 정상 쥐에 비하여 CIA가 유도된 생쥐에서 CD19<sup>+</sup> 세포수가 매우 증가하였으며, JTT를 투여한 경우에는 그 수가 현저히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Table 3),

CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포와 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 수 역시 대조군에

비하여 감소하는 것을 (Table 3) 확인할 수 있었다.

임파절의 면역 세포 분포를 조사한 결과 정상군에 비하여 CIA가 유도된 경우에 총 면역세포 수 (Table 2) 및 조사한 모든 면역세포 (CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4/CD25<sup>+</sup>, CD3/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD49<sup>+</sup> 및 CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>) 수가 CIA가 유도된 대조군에 비하여 증가하는 것을 확인하였다 (Table 3,4). 말초 혈액에서는 CD3/CD69, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25, 세포 수는 감소한 반면 (Table 6) CD49b<sup>+</sup> 세포 수는 증가함으로써 (Table 6), JTT가 말초혈액에서 helper T 세포수를 감소하는 작용이 있음을 알 수 있었다. CD49b<sup>+</sup> 세포는 JTT에 의하여 임파절과 말초혈액 (Table 4,6)에서 모두 증가하였는데, 이들 세포는 미성숙 수지상세포를 반복적으로 주사 할 때 생성되는 T 세포에 발현되는 분자로서 CIA를 억제하는데 중요한 역할을 하는 조절 T 세포에 발현되는 분자로 알려져 있다<sup>35)</sup>. 따라서 JTT가 CD49b<sup>+</sup>인 조절 T 세포를 활성화할 가능성을 제시 하였으나, 항 후 더욱 자세한 조절 과정에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 한편 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포는 조절 T 세포로서, 이들이 활성화된 T 세포 면역 체계를 조절한다고 알려져 있으며, IL-10 이나 TGF-β를 분비함으로써 과도하게 활성화된 면역 체계를 조절하는 것으로 보고되었다<sup>34)</sup>. JTT 투여는 비장에서는 대조군에 비하여 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 수를 감소시키는 반면 (Table 3), 임파절에서 증가하는 경향 (Table 4)을 나타냄으로써 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 추측 할 수 있으나, 이들 세포가 IL-10이나 TGF-b와 같은 사이토카인을 발현하는지와 이에 대한 조절 기작에 대하여서는 보강 연구 필요할 것으로 보인다.

관절염이 발생한 관절 조직에서는 CD3<sup>+</sup> 세포 및 CD11<sup>b</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포의 수가 급격하게 감소한 것을 확인할 수 있었는데 (Table 5), 이러한 결과는 JTT가 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 및 CD11<sup>b</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 염증 세포의 관절로의 유입을 억제 할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

류마티스 관절염의 발생은 활막세포에서 분비되는 염증성 사이토카인이 매우 중요한 병리적 작용을 함으로서, 염증 반응과 연골의 파괴를 일으킨다고 알려져 있다<sup>14-16)</sup>. TNF-α 와 IL-6는 CIA 생쥐에서 매우 높게 발현되었으나 JTT 투여군에서는 혈중 농도가 낮게 유지됨으로써 매우 유의성 있는 결과가 나타났다 (Table 7).

류마티스 관절염은 Th1 면역 체계가 우세한 자가 면역성 질환이므로<sup>1)</sup> JTT가 Th1/Th2 면역 체계에 어떠한 영향을 나타내는지 살펴보기 위하여 CD3/CD28 이나 collagen을 이용하여 비장세포의 T 세포에서 분비되는 Th1 사이토카인인 IFN-γ와 Th2 사이토카인인 IL-4의 생성량을 조사하였다. 결과적으로 IFN-γ, IL-4의 분비는 주어진 자극의 종류 (CD3/CD28, collagen)에 상관없이 대조군에 비하여 그 생성이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Table 8).

항체 형성에 관한 JTT의 효과에서는 류마티스 인자로 알려진 IgM과 IgG, 콜라겐 특이적 항체 생산이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 (Table 9,10), 이러한 결과는 CD19<sup>+</sup> 세포 수의 감소와 더불어 일관성 있게 B 세포의 활성을 억제함으로써 병리적 항체 생성을 억제 한다는 것을 나타내주고 있다.

## 결 론

Collagen으로 관절염을誘發한 (CIA) 動物 病態 모델에 定痛湯 (JTT)을 投與한 후 臨床 症狀, 血液과 組織內的 免疫細胞 사이토카인 및 組織學的 變化 등을 檢索하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

定痛湯은 對照群에 비하여 關節염의 臨床 症狀이 有意적으로 抑制되었으며, 그 沮害 정도는 陽性 對照群으로 사용한 MTX 投與群과 비슷하였다. 定痛湯은 對照群에 비하여 spleen과 paw joint에서는 總細胞數를 有意性있게 減少시킨 반면 DLN에서는 有意性있게 增加시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 spleen에 存在하는 CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 細胞數를 濃度 依存的으로 減少시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 DLN에 存在하는 CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD49b<sup>+</sup> 및 CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 細胞數를 有意性있게 增加시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 paw joint에 存在하는 CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1 細胞數를 有意性있게 減少시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 PBMC 에 存在하는 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 細胞數를 有意性있게 減少시킨 반면, CD49b<sup>+</sup> 細胞數는 有意性있게 增加시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 血液內 存在하는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 生成量을 有意性있게 減少시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 CD3/CD28, collagen으로 活性化시킨 脾臟細胞 浮游液內 IFN- $\gamma$  生成量을 有意性있게 減少시킨 반면, IL-4 生成量은 有意性있게 增加시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 IgG, IgM의 血中 濃度를 有意性있게 減少시켰다. 定痛湯은 對照群에 비하여 collagen II 特異的 抗體 生成을 有意적으로 減少시켰다.

이상의 結果로 보아 定痛湯은 免疫細胞 數 調節, 炎症性 사이토카인 및 류마토이드 因子 生成 抑制 등을 통하여 關節염을 抑制하고 軟骨을 保護하는 作用을 發揮함으로써, 尙後 臨床에서의 폭넓은 活用이 期待된다. 아울러 構成 藥物中 아직 항류마토이드, 抗炎症 效能이 報告되지 않는 藥物이 많아 個別 藥物에 대한 檢索이 期待된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구 센터인 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구소센터 (TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

## 참고문헌

1. Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, 204:55-73, 2005.
2. Goldring, S.R., Gravalles, E.M. Pathogenesis of bone erosion in rheumatoid arthritis. *Current Opin Rheumatol*, 12:195-199, 2002.
3. Carson, D.A., Chen, P.P., Kipps, T. New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest*, 87:379-383, 1991.

4. Tighe, H., Chen, P.P., Trucker, R. et al. Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mic. *J Exp Med*, 177:109-118, 1993.
5. Weyand, C.M. et al. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Res Ther*, 7(Suppl 3):S9-S12, 2005.
6. Kotake, S. et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in RA patients. *Arthritis Rheum*, 44:1003-1012, 2001.
7. Takemura, S. et al. T cell activation in RA is B cell dependent. *J Immunol*, 167:4710-4718, 2001.
8. Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. T cell regulation in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 16:212-217, 2004.
9. Kaolowaki, K.M., Matsuno, H., Tsuji, H., Tunru, I. CD4<sup>+</sup> T cells from collagen-induced arthritis in mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol*, 97:212-218, 1994.
10. Kang, Y.M. et al. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med*, 195:1325 -1336, 2002.
11. Weyand, C.M. et al. Cell-cell interactions in synovitis Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2:457-463, 2000.
12. Mor, A. et al. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 115:118-128, 2005.
13. Kraan, M.C. et al. T cells, fibroblast-like synoviocytes and granzyme B<sup>+</sup> cytotoxic cells are associated joint damage in patient with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63:483-488, 2004.
14. Miossec, P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 16:218-222, 2004.
15. Miossec, P. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 13(Suppl, 12):S13-S16.
16. Klimiuk, M.C. et al. Production of cytokine and metalloproteinase in rheumatoid arthritis is T cell dependent. *Clin Immunol*. 90:65-78, 1999.
17. Ponchel, F. et al. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patient with rheumatoid arthritis. *Blood*, 100:4550-4556, 2002.
18. 이순보 외. 中醫痰病學. 학원출판사, p 264, 2003.
19. 한주원. 祛濕複合方이 류마토이드 關節염 치료효과에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 20(5):1241-1244, 2006.
20. 고광재. 생체의 류마토이드 관절염 실험 모델에서 加味靈仙除痛飲의 효과. 원광대학교 대학원, 2003.
21. 김철호 외. 황백 및 위영선 약침이 Lipopolysaccharide 유발 관절염의 IL-1 $\beta$  발현 억제에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌,

- 16(1):511-531, 1999.
22. Yoon, Joung Yi Lee, Ji Yun Sim, Sang Soo Kim, Chang Jong. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Fractions of *Plantago asiatica* Herb. *Chung-Ang journal of pharmacal sciences*, 17:129-147, 2003.
  23. 김영훈. 류마티스양 관절염에 응용되는 방기의 효능에 관한 실험적 연구. *東西醫學*, 12(4):37-57, 1987.
  24. 최도영 외. 목통 약침자극이 통풍 유발 흰쥐에 미치는 영향. *大韓鍼灸學會誌*, 14(2):173-189, 1997.
  25. 송인광 외. 전갈 약침이 adjuvant 유발 흰쥐의 관절활액내 cytokine과 prostaglandin E2에 미치는 영향. *大韓鍼灸學會誌*, 19(2):177-188, 2002.
  26. Ricardo, T., Paniagua, Orr Sharpe, Peggy P. Ho, Steven M. Chan, Anna Chang, John P. Higgins, Beren H. Tomooka, Fiona M. Thomas, Jason J. Song, Stuart B. Goodman, David M. Lee, Mark C. Genovese, Paul J. Utz, Lawrence Steinman, and William, H. Robinson Selective tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate for the treatment of autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.*, Oct 116:2633-2642, 2006.
  27. Jung Won Moon, Min Suck Oh. Inhibitory effect of Coicis Semen composition on inflammatory responses in the collagen-induced arthritis mouse model. *Korean journal Oriental Physiology & Pathology*. 20(5):1311-1314, 2006.
  28. 곽중문 외. 疎風活血湯加味方이 collagen으로誘發된 생쥐의關節炎 억제에 관한 연구. *동의병리학회지*, 16(4):810-817, 2002.
  29. 서해경 외. 류마티스關節炎患者滑膜細胞에 대한鷄血藤의免疫反應. *동의병리학회지*, 17(3):780-786, 2003.
  30. 김호철 외. Human Monocyte의 IL-8 생산 억제에 미치는 류마티스關節炎 치료제로서의五加皮의 효과. *大韓本草學會誌*, 10(1):49-58, 1995.
  31. Ingrid Marty, Veronique Péclat, Gailute Kirdaite, Roberto Salvi, Alexander So, and Nathalie Busso. Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition. *J. Clin. Invest.*, 107:631-640, 2001.
  32. Morgan, M.E., Suttmuller, R.P.M. et al. CD25+ Cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 48:1452-1460, 2003.
  33. Morgan, M.E., Flierman, R. et al. Effective treatment of collagen induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, 52:2212-2221, 2005.
  34. Gavin, Ma, Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A. et al. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*, 3:33-41, 2002.
  35. Charbonnier, L.M., Duivenvoorde, L.M. and Apparally, F. Immature dendritic cell suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells. *J Immunol*, 177:3806-3813, 2006.
  36. Werfel, T., Boeker, E. and Kapp, A. Rapid expression of the CD 69 antigen on T cells and natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell suspensions. *Allergy*, 52:465-469, 1997.
  37. Sancho, D., Gomez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordon-Alonson, M. et al. CD 69 down regulates autoimmune reactivity through active transformin growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 112:872-882, 2003.
  38. Sancho, D., Gomez, M., Martines, D.H.G., Lamana, A. et al. CD69 targeting differentially affects the course of collagen-induced arthritis. *J Leukoc. Biol*, 80:1233-1241, 2006.
  39. Veena, Taneja and Chella, S., David, H.L.A. Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity. *J. Clin. Invest.*, 101:921-926, 1998.