

생약복합제제가 토끼의 퇴행성관절염 개선에 미치는 영향*

권태동[§] · 김기훈

경북대학교 레저스포츠학과

The effect of medicinal herb administration to arthritis induced rabbit arthritis treatment*

Kwon, Tae Dong[§] · Kim, Ki Hoon

Department of Leisure Sport, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the arthritis treatment and prevention of the effects the herbal administration to experimental animals induces arthritis 4 weeks for medicinal herbs (*Scutellaria baicalensis* Georgi, *Acanthopanax cortex*, *Achyranthis Radix*). To investigate the prevention of histopathological examination and molecular biological examinations for arthritis improvement in vivo New Zealand, white rabbits were divided into a normal (Normal, n = 7), or a collagen-induced arthritis (CIA, n = 7), or a collagenase injection and medicinal herbs (SAA, n = 7). It was confirmed that induced arthritis was treated with Gross examination, and the measurement of average arthritis index (MAI) and improved arthritis by medicinal herbs. TNF- α and IL-1 β were significantly increased in the CIA and SAA groups, compared to the normal group (p < 0.05). MMP-1 and TIMP-2 were significantly increased in the CIA, compared to the other groups (p < 0.05). MMP-1 and TIMP-2 were significantly decreased in the SAA group, compared to the CIA group (p < 0.05). As a result, Herbal administration used in this study might be able to help in the treatment of arthritis induced by inflammatory and immunosuppressive effects, that which can be expected. (Korean J Nutr 2012; 45(5): 437 ~ 442)

KEY WORDS: medicinal herbs, arthritis, inflammatory.

서 론

관절염은 주로 노화와 함께 장기간 지속되는 고질적 만성질환으로 아직까지도 그 발병원인이나 진단 및 치료법에 대한 명확한 기준이 제시되어 있지 않고 있다. 더욱이 현재까지 주로 시행되고 있는 관절염의 일반적 치료방법으로는 발병초기 염증 관련 생물학적 약물 (disease-modifying anti-rheumatic drug, DMARD) 치료에 주로 의존하고 있으며, 중증 이상의 병증일 경우에는 부득이 외과적 수술요법을 시행한 후 장기간의 면역억제제 투여를 병행하고 있는 실정이다.^{1,2)} 그러나 이러한 치료방법들은 질병의 병인과 예후에 따라 연령, 성별 등 개인별로 그 치유정도에 현저한 차이를 보이고 있음은 물론 장기간의 강한 면역억제제 투여에 따른 약물부작용의 위험성에 노출되어 있어 해당 질환의 관리에 있어 예방의 중요성이 무엇보다 강조되

는 질병이라 할 수 있겠다.³⁾ 따라서 일반적으로 발병초기 물리적 치료요법을 포함한 외과적 치료과정과 병행하여 시행하고 있는 비외과적 요법에 대한 부작용의 위험성을 최소화 할 수 있는 약제 혹은 생약제제의 개발은 해당 질환을 관리하고 예방하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 이에 본 연구진은 최근까지 국내외 골관관 질환 연구를 통해 밝혀지고 있는 생약제제의 효능을 검색한 결과 10여종의 생약제제에 대해 만성골 질환에 대해 염증억제 및 항면역효과에 대한 가능성을 있음을 확인 할 수 있었으며,^{4,7)} 이들 10종 여종의 생약제제에 대한 성분 및 독성검사를 포함한 사전실험 과정을 거친 후 적합성을 판단하여 면역기능 검사 (in vitro)를 거친 결과, 안정성과 재료확보의 편의성을 고려하여 황금 (*Scutellaria baicalensis* Georgi), 오가피 (*Acanthopanax cortex*) 그리고 우슬 (*Achyranthis Radix*)을 선정할 수 있었다.

한편, 대표적인 자가면역질환의 하나인 관절염은 혈액 및 관

접수일: 2012년 9월 10일 / 수정일: 2012년 9월 22일 / 채택일: 2012년 9월 26일

*This Research was supported by Kyungpook National University Research Fund, 2010.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: tdkwon6086@hanmail.net

© 2012 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

절혈액에 면역관련 염증성 사이토카인 (cytokine)들의 발현을 유도하는 것을 알려져 있는데, 그 중 Interleukine-1 β (IL-1 β)는 입과구에 작용하여 감염에 대한 숙주의 급성기 반응의 다양한 작용을 매개함으로써 생체방어에 중요한 역할을 담당하며, tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 류마티스 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, 연골세포에 작용해서 collagenase의 과잉 생산을 촉진하는 매개로 작용하는 대표적인 염증유발 사이토카인으로 알려져 있다⁹⁾. 또한 종양세포의 생물학적 특징 및 예후를 관찰하는 연구들에서 종양 단백질 분해 효소와 관련하여 관절염이 유발된 활액내에서 콜라겐 분해 효소로 알려진 Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)는 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)의 발현과 균형을 이룸으로써 기저막의 분해대사를 조절하는 생체방어 반응 사이토카인으로 알려져 있다.^{9,10)}

본 연구에서는 사전실험을 통해 염증억제 및 항면역효과가 있을 것으로 생각되어지는 3종 (황금, 오가피, 우슬)의 생약제제를 열수추출하여 혼합한 복합제를 관절염 유도 실험동물 (New Zealand white rabbits)에게 4주간 투여한 후 관절염 치료 및 예방효능 정도를 알아보기 위해 조직병리학적 검사 및 분자생물학적 검사를 실시하였다. 이는 골관절 질환의 예방 및 치료를 위한 새로운 생약제제의 효능을 확인하는 계기가 될 수 있을 것이며, 나아가 생약복합제제에 대한 신물질 개발에 기초자료로 제공될 수 있을 것이다.

연구방법

실험동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험동물은 생물학적, 해부학적 및 시험물질에 대한 감수성 등의 측면을 고려하여 후지가 잘 발달되어 인체의 관절과 유사한 해부학적 구조와 크기를 가지고 있다고 판단되는 New Zealand white rabbits (2.5~3 kg)을 선택하였다.^{5,11)} 선택된 실험동물은 전체 3군으로 구분하였는데, 정상군인 Normal (n = 7)군과 collagenase로 관절염을 유도한 관절염 유도군 (Collagenase-induced arthritis, n=7; CIA), 그리고 관절염 유도 및 황금·오가피·우슬 추출물 섭취군 (collagenase-induced arthritis and Scutellaria/Acanthopanax/Achyranthis Radix extract supplementation, n=7; SAA)으로 구분하였다.

실험을 위해 사용된 3종의 시료 (황금, 오가피, 우슬)는 발효제조기 (NUC COM, NGM1810, KOREA)에서 12시간 동안의 열수추출 과정을 거쳐 생산하여 각각 1 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 제작하였다. 실험동물의 시료투여는 실험실 조건에서 일주일간 순화 후 실험 7일째부터 4주간 시료의 양이 200 mg/kg가 되도록 하여 매일 오전 10시에 약 2.5 mL씩 경구 투여하였으

며, 실험집단을 제외한 나머지군들에 대해서는 경구투여에 대한 자극을 동일시하기 위해 동량의 식용수를 동일한 방식으로 처치하였다. 또한 collagenase로 관절염을 유도한 실험집단에 대해서는 실험 1일과 5일에 주사기 (21Gauge)를 이용하여 오른쪽 관절내로 250 μ L collagenase solution (4 mg/mL, Clostridium histolyticum, type II; enzyme activity 425 U/mg)을 주입하였다.

실험에 동원된 모든 실험집단들은 토끼전용 cage(60 cm \times 60 cm \times 40 cm)에 각각 1마리씩 넣어 23 \pm 3 $^{\circ}$ C의 온도와 50 \pm 5%의 습도를 유지한 실험실 환경에서 12시간 간격의 명암 주기에 적용하였으며, 주 1회 체중 및 평균관절염 지수 (mean arthritic index; MAI)를 측정하였다. 즉, 지수의 0점은 부종이나 종창이 없는 상태를 의미하고, 1점은 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적 증후를 보일 때로 하였으며 2점은 발목관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적 증후가 관찰될 경우로 하였다. 또한 3점은 발목관절에서 족근골에 걸쳐 중등도의 부종과 발적 증후가 관찰될 경우에 해당하며 최종 4점은 발목에서 다리전체에 걸쳐 부종과 발적이 있고 관절경직이 나타나는 경우로 제한하여 각 단계별 지수를 규정하였다. 한편, 실험기간동안 실험동물에게 제공되는 일반사료 및 물섭취는 통제하지 않았다.

시료의 채취 및 분석

실험 5주째 다음 당일 오전에 실험동물의 복강에 45 mg/kg ketamine hydrochloride (KETAMINE 50, Yuhan, Korea) 과 2 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, Korea)을 복강내로 주입하여 마취한 후 전염증성 사이토카인 분석을 위해 혈액 및 synovial fluid을 채취한 후 조직병리학적 관찰을 위해 실험동물의 오른쪽 다리관절의 일부를 일정하게 절취해 250 μ L collagenase solution (4 mg/mL)에 완전히 담근 후 분석에 임하였다. 전염증성 사이토카인 분석은 ELISA (Uscn life Science Inc., Houston, USA) 측정법을 이용하여 각각의 항체 즉, TNF- α (E0133Rb)와 IL-1 β (E0563Rb) 그리고 MMP-1 (E0097Rb)와 TIMP-2 (E0128Rb)에 반응하여 최종 Biotrack II (Amersham Biosciences) Plate Reader (450 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 또한 조직병리학적 관찰을 위해서는 Matrix proteoglycan을 염색하는 toluidine blue (TB) 염색기법 응용한 이중염색을 실시하여 전자현미경상에서 Axioskop camera 로 이미지화 하였다.¹²⁾

자료분석

실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS/PC+를 이용하여 각 변인별 평균과 표준편차를 산출하였으며, 관절염지수의 변화양상에 대해서는 paired t-test를 실시하였으며, 집단 간 차이에

대해서는 일원변량분석 (one-way ANOVA)을 이용하였다. 또한, 결과분석에 따른 집단 간 유의수준에 대한 사후검증으로 Tukey's multiple range test를 사용하였으며, 이때 유의수준은 $p < .05$ 로 하였다.

결 과

육안적 관찰 및 평균관절염지수의 변화

본 연구에서 collagenase 주입에 따른 관절염 유발은 (Fig. 1)과 같으며, 5주간의 생약복합제제 섭취 후 관찰된 관절염지수에 대한 변화는 (Table 1)과 같이 Normal 군을 제외한 CIA 군과 SAA 군에서 모두 관절염지수 3 이상의 중등도 관절염 증상을 보여주어 실험대상 동물들에게 관절염이 잘 유발되었음을 확인 할 수 있었으며, 실험 5주 후 SAA 군이 CIA 군에 비해 유의하게 개선되는 것으로 나타났다 ($p < .05$).

조직검사 결과

Collagenase로 관절염을 유도한 후 4주간의 생약복합제제

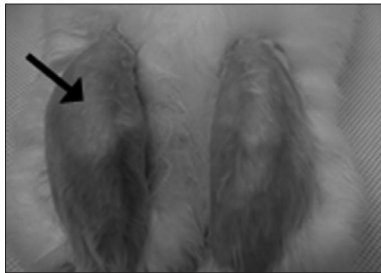


Fig. 1. The collagenase injected knee of rabbit (arrow) was more swollen compared with the other knee.

Table 1. Change of mean arthritic index (MAI)

	Before	After 5 weeks	t-value	p-value
Normal	0	0	0	0
CIA	3.79 ± 0.28	2.29 ± 0.39	13.748***	.001
SAA	3.79 ± 0.27	1.71 ± 0.27	15.884***	.001
F-value	702.250***	131.368***	-	-
p-value	.001	.001	-	-
post-hoc	C < B	B < C		

***: $p < .001$. B = CIA, C = SAA. CIA: Collagen-induced arthritis, SAA: Scutellaria/Acanthopanax/Achyranthis Radix induce

투여를 통한 조직병리학적 변화를 toluidine blue (TB) 염색기법을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 (Fig. 2)에서 처럼 Normal군의 경우 특이적 소견을 보이지 않아 정상적인 조직형성을 보인 반면, 관절염이 유도된 CIA의 경우 실험처치로 인해 손상된 연골조직에서 가장 연한 toluidine blue 염색성을 나타내 cartilage matrix의 변성을 보여 주고 있으며 (양쪽화살표), endochondral region에 섬유아세포 (fibroblast)와 신생혈관 생성이 관찰되어 (점선원형) 병소주변으로 호산성이 풍부한 세포질의 침윤이 일어나는 것을 관찰 할 수 있었다. 한편, 생약복합제제 섭취군인 SAA군에서는 일부 다소 얇은 형태의 연골층 (화살표)을 보여주어 관절염 유도에 의한 연골 손상을 확인하였으며, 미성숙 연골세포들이기는 하지만 경계 부위에 proliferative layer가 다소 형성되어 있는 점으로 볼 때 관절염 유도에 의한 손상 후 연골수복이 일어나고 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

전염증성 사이토카인

본 연구의 집단별 혈청 TNF- α (ng/mL)는 (Fig. 3)에서와 같이 Normal군의 경우 62.07 ± 11.63 인데 비해 CIA군과 SAA군에서 각각 114.29 ± 23.93 과 94.71 ± 20.43 으로 나타나 두 군에서 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ($p < .05$). 또한, SAA군의 경우 CIA군에서 비해 다소 감소하는 경향을 보였으나 두 집단 유의차이는 없었다. 한편, 혈청 IL-1 β (ng/mL)의 변화에서도 CON군의 경우 94.93 ± 22.98 인데 비해 CIA과 SAA군에서 각각 167.57 ± 30.54 와 160.86 ± 25.86 로 나타나 두 군에서 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ($p < .05$). 역시 SAA군에서는 CIA군에 비해 다소 감소하는 경향만을 보여주었다.

활액에서의 MMP-1 및 TIMP-2의 변화

콜라겐분해 효소의 하나인 MMP-1 (pg/mL)의 활액내 생성 차이는 Fig. 4에서처럼 Normal군의 132.86 ± 42.26 에 비해 CIA군과 SAA군에서 271.43 ± 64.47 과 190.71 ± 40.77 로 나타나 두 군에서 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ($p < .05$). 또한, SAA군은 CIA군에 비해 유의한 차이로 낮은 수치를 보여주었다($p < .05$). 한편, 활액내에서의 TIMP-2 (pg/mL)의 생성차이는 정상군인 Normal군의 90.57 ± 16.80 에 비

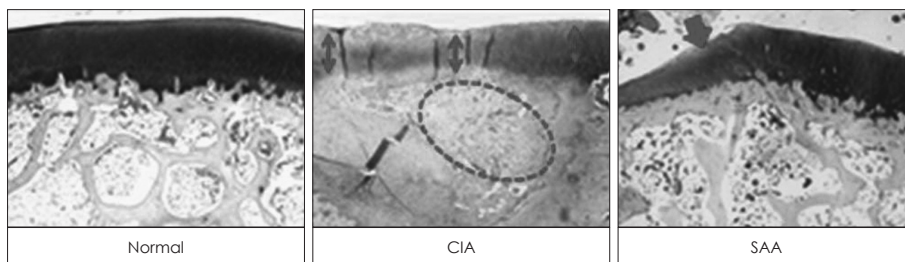


Fig. 2. Immunohistochemical stain of knee joints (TB protocol, $\times 400$).

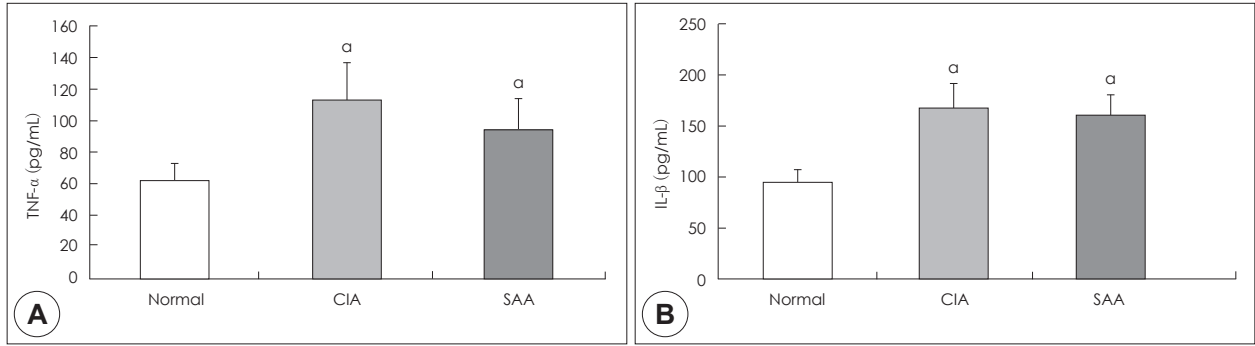


Fig. 3. The concentration of TNF-α (A) and IL-1β (B) in the blood of rabbits after 4 weeks treatment of each samples. a: p < .05 vs. normal.

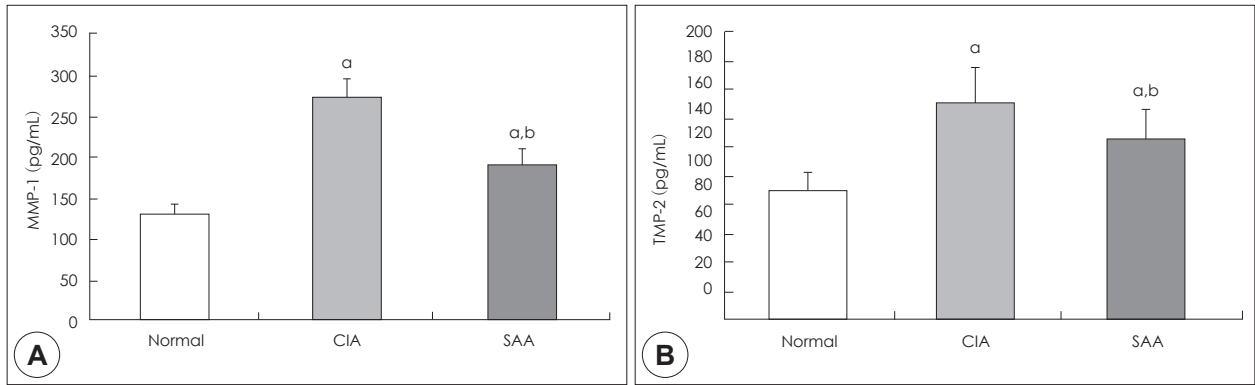


Fig. 4. The concentration of MMP-1 (A) and TIMP-2 (B) in the synovial fluids of Rabbits after 4 weeks treatment of each samples. a: p < .05 vs. Normal, b: p < .05 vs. CIA.

해 CIA군과 SAA군에서 각각 150.71 ± 26.84 와 126.14 ± 15.94 로 나타나 두 군에서 모두 유의하게 증가하였으며($p < .05$), SAA군은 CIA군에 비해 유의한 차이로 낮은 수치를 보여주었다 ($p < .05$).

고 찰

본 연구에서는 사전실험을 통해 염증억제 및 항면역효과가 있을 것으로 생각되어지는 3종 (황금, 오가피, 우슬)의 생약제제를 열수추출하여 혼합한 복합제를 관절염 유도 실험동물에게 4주간 투여한 후 관절염 치료 및 예방효능 정도를 알아보기 위해 조직병리학적 검사 및 분자생물학적 검사를 실시하였다. 그 결과 먼저 육안적 검사를 통해 실험동물의 관절염 모델 생성이 잘 유도되었음을 확인 할 수 있었다. 이후 주별로 시행된 평균 관절염 지수 측정검사를 통해 관절염 유도군 (CIA)에 비해 생약복합제제 투여군 (SAA)에서 4주 후 유의한 개선효과를 확인 할 수 있었다. 이는 조직병리학적 검사 결과에서도 동일한 소견을 보여주었는데, TB (toluidine blue) 염색법에 의한 연골세포 (chondrocyte) 및 기질 (matrix) 배열을 살펴본 결과 정상군 (Normal)에 비해 관절염 유도군에서 현저하게 기질 호염성이 강한 침윤현상 및 세포주위 기질을 포함한 연골세포에서의

이상소견을 확인 할 수 있었다. 반면, 생약복합제제 투여군에서는 개체별로 연골표면 및 기질에서의 배열이 다소 불규칙하지만 관절염 유도군에 비해서는 병소 주변의 fibroblast와 신생혈관 생성 정도가 상대적으로 활성화된 것으로 볼 때 손상된 부위에 대한 수복정도가 개선된 것을 확인 할 수 있다. 이는 본 실험에서 처치한 collagenase에 의한 관절 손상 후 연골재생 및 기질생성의 치유과정이 보다 빨리 진행되는 것으로 추론할 수 있다.

현재까지 밝혀진 관절염의 발병원인으로는 항원의 자극을 받은 해당 관절 부위의 항원지시세포가 T 림프구의 활성을 유도하여 파골세포를 자극하는 각종 염증성 사이토카인(cytokine)들의 상호반응을 통해 골흡수 및 골파괴가 진행되는 자가면역질환의 병태적 기전을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.^{13,14)} 또한, 최근 들어 분자생물학분야의 이해가 깊어지면서 관절염 질환과 세부 염증성 사이토카인들의 연관성이 밝혀지고 있는데 이들 대부분이 면역조절 물질에 해당된다 할 수 있다. 그 중 특히, TNF-α와 IL-1형들은 대식세포에서 생산되는 상위 사이토카인으로써 최근 다양한 실험을 통해 관절염 환자의 관절 활막조직에서 발현이 유도됨이 보고되고 있어 류마티스 관절염 병인기전에 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 인식되고 있으며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 골 관절염 치료를 위한 생물학적 제제로써 이

에 대한 길항제가 가장 많이 상용되고 있다.¹⁸⁾

일반적으로 종양괴사 인자로 알려져 있는 TNF- α 는 시상하부-뇌하수체-부신 (HPA)의 축에 의해서 조절되며, 그 발현은 염증발생의 주요 요인으로 알려져 있다. 특히 혈액내 TNF- α 의 발현은 혈관 내피세포의 활성을 유도하여 여러 가지 화학물질의 분비를 촉진하게 되어 염증관련 세포들의 이동을 촉진하는 결과를 초래하게 된다. 또한 IL-1 β 는 혈관의 염증반응을 촉진하는 전구 염증 사이토카인으로 감염에 대한 숙주의 급성기 반응의 다양한 작용을 매개함으로써 생체방어에 중요한 역할을 담당하고 혈관내피세포내의 활성화된 단핵구의 생성을 촉진하는 역할을 하게 된다. 때문에 최근 이러한 TNF 이성체의 발현율은 염증성질환 등은 물론 비만 관련 질환 및 노화 등과 관련된 염증반응 정도를 평가하는 지표로 이용되고 있다.¹⁹⁾ 본 실험에서도 이들 두 가지 사이토카인들의 변화에서 모두 관절염 유도군이 정상군에 비해 유의하게 높게 나타나 관절염 유발에 따른 염증반응을 확인할 수 있었다. 그러나 기대하였던 생약복합제제 투여군에서 관절염 유도군에 비해 다소 감소하는 경향을 보였을 뿐 통계적 유의차이는 없었다.

현재 까지 밝혀진 염증성 전이의 일반적 기전은 일차적으로 주변 세포의 침습을 의해 기저막과 세포외기질 단백질을 분해하는 매우 복잡한 과정을 거치게 되는데, 이 과정에서 MMP는 제4형 콜라겐과 fibronectin을 분해하고 신생혈관 형성을 억제하여 염증의 전이 및 침습을 유도한다. 따라서 MMP는 류마티스성 관절염, 폐기종, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양혈관신생 등의 병리 과정에서 이상발현이나 활성화가 과다하게 유도된다.^{20,21)} 한편, TIMP-2는 MMP에 의한 기질 분해작용을 조절하는 억제인자로 정상조직에서는 MMP와 TIMP의 분비가 균형을 이룸으로써 기저막의 분해대사가 적절히 조절되지만 악성일 경우 이들 간의 불균형으로 인해 염증성 전이가 유도된다고 알려져 있다.^{9,10)} 이처럼 세포기질의 항상성은 단백질 분해에 관여하는 MMP와 내분비 억제인자인 TIMP의 상호작용에 의해 유지되며 이 과정을 통해 광범위한 세포외기질의 분해 및 재구성이 이루어진다.

본 연구에서는 병소 주변에서 채취한 활액에서 이들의 활성 정도를 측정하였다. 그 결과 관절염 유도군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하여 ($p < .05$) 염증성 병리상태에서의 활성증가를 확인할 수 있었다. 또한 생약제제투여군에서 관절염 유도군에 비해 유의하게 감소하는 경향을 보여주어 ($p < .05$) 해당 복합제 투여에 따른 염증억제 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 TIMP-2가 단순히 MMP 기능을 억제할 뿐 아니라 비활성 Pro-MMP를 활성화된 MMP로 활성화시키는 기능도 있다는 최근의 보고^{22,23)}에서처럼 MMP와 TIMP의 불균형에 따른 생체방어 반응의 예후로 이해할 수 있으며 본 연구에서 적

용된 생약복합제제의 염증 및 면역증가 억제 효과를 반영한 결과로 사료된다.

이처럼 본 연구에서 제시하고 있는 염증성 사이토카인들이 활액에서 보다 활액에서 그 활성억제가 유의하게 작용한 것은 우선 병소 주변에서 직접 활성정도를 측정된 것에 기인될 수 있을 것이며, 본 연구에서 적용된 시료투여의 적용기간 연장 및 투여량 증가를 통해 보다 긍정적인 결과를 보여줄 수 있는 가능성을 시사하는 결과로 생각할 수 있다. 다만 이에 대해서는 추후 연구의 진행이 절실히 요구되어지는 부분이라 할 수 있겠다.

요약 및 결론

본 연구에서는 사전실험을 통해 염증억제 및 항면역효과가 있을 것으로 생각되어지는 3종 (황금, 오가피, 우슬)의 생약제제를 열수추출하여 혼합한 복합제를 관절염 유도 실험동물 (New Zealand white rabbits, 2.5~3 kg)에게 4주간 투여한 후 관절염 치료 및 예방효능 정도를 알아보기 위해 조직병리학적 검사 및 분자생물학적 검사를 실시하였다. 그 결과 육안적 검사 및 평균관절염 지수 측정 (MAI)에서 collagenase 투여에 따른 관절염 유도 양상을 확인 할 수 있었으며, 생약복합제제의 투여를 통해 이를 개선할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 TB 염색기법을 이용한 조직병리학적 검사 결과에서도 이를 뒷받침 해주고 있다. 한편, 본 연구에서는 활액 및 활액에서의 면역관련 단백질들의 활성을 확인 하였는데, 활액에서는 관절염 유도에 대한 TNF- α 와 IL-1 β 의 증가만을 확인할 수 있었으며, 시료투여에 대한 염증억제 효과는 확인할 수 없었다. 그러나 활액에서의 경우 MMP-1 및 TIMP-2에서 관절염 유도에 대한 활성증가와 더불어 시료투여를 통한 활성억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이상의 결과는 본 연구에서 적용된 생약복합제제투여가 염증 및 면역억제 효과를 유도함으로써 관절염의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 기대할 수 있다.

Literature cited

- 1) Quinn MA, Green MJ, Marzo-Ortega H, Proudman S, Karim Z, Wakefield RJ, Conaghan PG, Emery P. Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum* 2003; 48(11): 3039-3045
- 2) Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2): 357-365
- 3) Lard LR, Visser H, Speyer I, vander Horst-Bruinsma IE, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JM. Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: Comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 2001; 111(6): 446-451

- 4) Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: Elevation of prostaglandin D2 levels. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(4): R64
- 5) Park KC, Park EJ, Kim ER, Kim Y, Chung SH, Cho BW, Kim S, Jin M. Therapeutic effects of PG201, an ethanol extract from herbs, through cartilage protection on collagenase-induced arthritis in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(4): 1469-1477
- 6) Shin SS, Jin M, Jung HJ, Kim B, Jeon H, Choi JJ, Kim JM, Cho BW, Chung SH, Lee YW, Song YW, Kim S. Suppressing effects of PG201, an ethanol extract from herbs, on collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(5): 665-672.
- 7) Gao XY, Wang DW, Li FM. Determination of ecdysterone in *Achyranthes Bidentata* and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells. *Yao Xue Xue Bao* 2000; 35(11): 868-870
- 8) Goldring SR, Gravalles EM. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(3): 195-199
- 9) Salinardi BJ, Roush JK, Schermerhorn T, Mitchell KE. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and synovial fluid of osteoarthritic dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19(1): 49-55
- 10) Giannelli G, Erriquez R, Iannone F, Marinosci F, Lapadula G, Antonaci S. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(3): 335-338
- 11) Huh JE, Baek YH, Kim YJ, Lee JD, Choi DY, Park DS. Protective effects of butanol fraction from *Betula platyphylla* var. *japonica* on cartilage alterations in a rabbit collagenase-induced osteoarthritis. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3): 515-521
- 12) Ekenstedt KJ, Sonntag WE, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of chronic growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on osteoarthritis severity in rat knee joints. *Arthritis Rheum* 2006; 54(12): 3850-3858
- 13) Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(2): 161-170
- 14) Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 2006; 6(1): 13-19
- 15) Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007; 370(9602): 1861-1874
- 16) Choy E. Clinical experience with inhibition of interleukin-6. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(2): 405-415
- 17) Andreaskos ET, Foxwell BM, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(4-5): 299-313
- 18) Cole P, Rabasseda X. The soluble tumor necrosis factor receptor etanercept: a new strategy for the treatment of autoimmune rheumatic disease. *Drugs of Today (Barc)* 2004; 40(4): 281-324
- 19) Eijsbouts AM, Kempers MJ, van den Hoogen FH, Laan RF, Hermus AR, Ross HA, Sweep FC, van de Putte LB. Effects of naproxen and sulphasalazine or methotrexate on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(1): 35-42
- 20) Francoz D, Desrochers A, Simard N, Saint Pierre Y, Fecteau G, Latouche JS, Fortin M. Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid from healthy calves and calves with experimentally induced septic arthritis. *Am J Vet Res* 2008; 69(8): 1022-1028
- 21) Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996; 149(1): 273-282
- 22) Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011; 12(11): 233
- 23) Robert V, Hideaki N, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827-839