

編號：CCMP93-RD-103

中藥調控細胞激素基因在類風濕性關節炎 疾病感受性與嚴重度之影響 (3-3)

張德明

國防醫學院

摘 要

抗風濕中藥包括雷公藤已知具有 T 細胞免疫調節之功能，雷公藤更可抑制 B 細胞產生抗體。因此應對可產生類風濕因子，並以 T 細胞為病主軸的類風濕性關節炎有效。本實驗測試了雷公藤對於類風濕性關節炎致病機轉中主要細胞—滑膜細胞之影響。

目前的研究指出細胞激素基因之基因表現量 (gene expression) 極有可能與關節炎的嚴重度有密切的關係，因此我們收集類風濕性關節炎置換之關節滑膜，並以在類風濕性關節炎的發炎機制中重要細胞激素 IL-1 用來刺激此細胞進一步的分析了是否中藥能改變細胞激素基因的表現量，但經過雷公藤處理 18 小時的滑膜細胞，而其細胞中之細胞激素基因 (IL-1 β 、IL-12 p35 和 IL-23 p19) 和趨化激素 (IL-8) 表現量改變—以 RT-PCR 的方式分析，同時以 collagen II 建立小鼠的關節炎模式，每天給予雷公藤治療，之後進行其小鼠之病理變化和其細胞中之上述細胞激素基因表現量改變。

雷公藤能降低在細胞中經由 IL-1a 所誘發的細胞激素基因 IL-23 p19 和 IL-1 β 和趨化激素 (IL-8) 的表現量，這些在關節炎中具有嚴重的破壞力的細胞激素，但是對於細胞激素 IL-12 p35 並不影響，且在小鼠的關節炎模式中，當我們每天給予 0.3mg/kg 之雷公藤則可在約一個禮拜內消除小鼠後腿腫脹之形況。這些證據能夠幫助我們了解到雷公藤在類風濕性關節炎治療上的意義。

關鍵詞：雷公藤、類風濕性關節炎、細胞激素

Number: CCMP93-RD-103

Regulation of Cytokine Gene Polymorphisms by Herbal Medicine Affects the Susceptibility and Severity of Rheumatoid Arthritis (3-3)

Deh-Ming Chang

National Defense Medical Center

ABSTRACT

To test the effects of *Tripterygium Wilfordii* Hook-f (TWHf) on the regulation of cytokine genes of synovial cells and to identify their potential mechanisms of action in the therapy for rheumatoid arthritis (RA).

Human synovial fibroblasts from patients of RA were stimulated with or without IL-1 α in the presence or absence of TWHf. The expression of IL-23 p19 subunit and IL-12 p35 subunits message RNA (mRNA) in human fibroblast like synoviocytes (HFLS-RA) in RA patients were determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of IL-23 p19 at the protein level was confirmed by Western blotting. Blockade of NF-kappaB activation was used to verify the mechanism of the induction of p19. Secondly, we tested the effects of TWHf on cytokine genes (IL-1B), chemokine gene (IL-8) and MMP-13 gene expression from fibroblast cells. At last, use animal model of RA determine the function of TWHf in therapy.

IL-1 α could induce RA fibroblast-like synoviocytes to produce IL-23 P19 subunit. IL-23 p19 mRNA could not be found in unstimulated HFLS-RA. IL-1 α induced IL-23 p19 gene expression in HFLS-RA. These responses were observed

in both a dose-responsive and time-dependent manner. IL-1 α did not obviously enhance gene expression of p35 of IL-12. In addition, the NFkappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) down-regulated the expression of IL-23 p19 mRNA induced by IL-1 α . Furthermore, Chinese herbal TWHf could reduce IL-1 α induced-IL-23 p19 expression in HFLS-RA. TWHf has no effect on IL-12 p35 mRNA expression in HFLS-RA. TWHf also suppressed the IL-1 α -induced cytokine gene of IL-1 β and IL-8 and MMP-13 messenger RNA levels in synovial. Therapeutic administration of TWHf at 0.3 mg/kg, i.p., every day, significantly reduced the severity of CIA.

Our results demonstrated the mechanisms of action of TWHf and indicated their potential role in treating RA.

Keywords : TWHf, cytokine, arthritis rheumatoid

壹、前言

類風濕性關節炎是一種複雜多因子的發炎性關節疾病，遺傳與環境兩大因素，皆與疾病感受性 (susceptibility) 和嚴重度 (severity) 有密切關係。過去研究顯示主要組織相容複合體 (major histo compatibility complex; MHC) class II 區的基因為產生該疾病的重要遺傳因素，而 HLA-DR4 則與較嚴重的病程相關^(1,2)。但是人類白血球表面抗原 (HLA) 複合體僅至多代表整個遺傳背景中的 30-50%⁽³⁾。因此一定有其他重要基因在致病過程中扮演了重要角色。對嚴重且破壞力強的關節炎而言，早期使用疾病緩解抗風濕藥物 (disease-modifying antirheumatic drug) 將有很大的助益，故早期診斷和預測疾病嚴重度，在臨床處置上即亦顯重要。因為細胞激素在類風濕性關節炎的致病機轉中扮演重要角色，因此細胞激素之基因表現量 即極有可能與關節炎的嚴重度有密切關係，且可能被視為疾病嚴重度的標記。

在治療自體免疫疾病的中藥之中，首推雷公藤在人體的實驗中最為明瞭。雖然這種抗風濕中藥已被廣泛的用於臨床上治療病人，但一般醫藥學的研究者對它們的作用機轉並不十分清楚。雷公藤 (Tripterygium wilfordii Hook F, TWHF) (Lei Gong Teng or thunder god vine) 為藤狀植物，生長於南中國的廣大地區，其根部純化的萃取物，已做成錠劑，並用以治療類風濕性關節炎及全身性紅斑性狼瘡等慢性疾病⁽⁴⁾。此藥在動物實驗中並已證明其療效^(5,6)。我們先前曾對雷公藤對淋巴球的免疫抑制作用機轉作過分析，發現雷公藤很有效的抑制 B 和 T 淋巴球的活化，在高濃度時也能導致 T 淋巴球的自然死亡^(7,8)。雷公藤又被證明可部份或完全抑制 TNF-alpha、IL-1 和 IL-17 誘發的 MMP-3 和 MMP-13，及在 (2.5-10ng/mL) 濃度下抑制 IL-1 的產生⁽⁹⁾。其抗發炎效應也被認為與抑制 cyclooxygenase-2 mRNA 和 prostaglandin E2 合成有關⁽¹⁰⁾。這類中藥萃取物將有相當重要的潛力。所以本研究擬選用雷公藤萃取物漢防己甲素純化物進行類風濕性關節炎模式之實驗，評估這兩種中藥成份的療效。

第一介白質 (interleukin-1) 是最強的致炎物質之一，在關節發炎及破壞中皆扮演中軸的角色。第一介白質接受體拮抗蛋白 (IL-1 receptor antagonist) 為自然的競爭性抑制蛋白，因佔據細胞表面第一介白質接受體而抑制第一介白質活性，但卻不致傳遞任何訊息⁽¹⁵⁾。第一介白質接受體抑制蛋白的角色則為重要的發炎調節者，其功效也正在臨床試驗中。

第一介白質的基因位於第二對染色體上，和第一介白質接受體抑制蛋白的基因有緊密的相連⁽¹⁶⁾。第一介白質不同的基因多形性已被發現，其中至少有二項會影響蛋白質產製：其一位於啟動區（promotor region）⁽¹⁷⁾，另一則位於 exon5⁽¹⁸⁾，另在第一介白質接受體抑制蛋白的 86 basepair 已有五個位於 intron 2 的被報告⁽¹⁹⁾，序列中因為有三個潛在的蛋白質結合區位於此 86 個-bp 之序列中，上述的基因變形即可能影響基因的轉錄和蛋白質的製造。

Stromelysin (MMP-3) 可破壞 proteoglycns、collagens、gelatins 和 aggrecan 的 link protein。MMP-3 和 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) 的不平衡造成軟骨破壞⁽²⁴⁾。血清及滑膜組織中 MMP-3 的上升可視為類風濕性關節炎發炎的標記⁽²⁵⁾。

隨著複製羊「桃莉」的誕生，開啟了基因複製與轉殖在生物科技研究的全新領域，加以「人類基因體計畫」即將完成，決定人類生命藍圖的三十億個遺傳密碼將進一步呈現眼前。如何在這「後基因」時代結合生物科技，醫學研究與電腦資訊等學門專長，瞭解各個基因的結構與功能，進而分析這些基因在生理狀態及各種疾病中所扮演的角色，將是下一世紀生物醫學研究的主流。對於中醫治療，利用基因表現的分析以了解不同藥物之間特性的相關基因，找出身體各症狀與分子生物特性的相關性，同時利用生物晶片（如：DNA 微陣列）來分析相關中醫證型之基因表現，以了解人體體質與相關基因表現之關係，實為一刻不容緩的醫藥重大課題。

動物模式提供了一個強而有力的工具以研究基因在複雜的人類疾病中所扮演的角色。類風濕性關節炎正是屬於這樣的疾病。而研究類風濕性關節炎最常用的動物模式即膠原蛋白誘發的關節炎，此乃用第二型膠原蛋白在老鼠身上誘發多發性關節炎⁽²⁶⁾。我們將以此模式研究中藥對細胞激素基因表現的影響。

在此一研究計畫中，我們將比較類風濕性關節炎與正常（或退化性關節炎）者滑膜細胞用不同濃度的中藥（雷公藤）測試其對兩種來源細胞中基因表現的影響；且我們將直接以膠原蛋白誘發之小鼠為類風濕性關節炎之動物模式，餵食中藥前，先比較誘發前後，周邊血液淋巴球和滑膜細胞中基因表現的差異；在餵食中藥後，再比較其對上述細胞之細胞激素基因表現的影響。

以人為本的治療是中西醫不謀而合的方向。辨證是診斷疾病在患者

的表現狀態，而時間變數可造成辨證轉型，因此尋找疾病診斷或治療的標記，即成為中西醫研究的方向。無論中西醫皆有同病異治或異病同治的狀況，體質是過去的解說，基因則是未來的方向。中醫疾病辨證結構中，疾病狀態等同病因 x 病性 x 病位 x 病勢。動物模式中，我們將 collagen 視為病因，關節視為病位，固定反應時間即病勢，而求病性即中藥治療對基因對偶質 (allele) 表現頻率與 carriage 比率的影響。此結果或可提供我們類風濕性關節炎感受性與嚴重度的標記，以及提供中藥治療效評估和預測的指標。

貳、材料與方法

In vitro 實驗

一、滑膜細胞和軟骨細胞的培養

我們將去年所收集的滑膜組織和軟骨細胞。實驗時，細胞將置於 96 孔的平底盤中，每孔加入 200 μ L DMEM 培養液 (Eulbecco's Modified Eagle Media, Gibco)，另加入 1%胎牛血清、2mM L-glutamine、3mM NaHCO₃、10mM HEPES、100 單位/毫升盤尼西林，和 100 μ g/毫升 streptomycin。培養盤中將加入不同濃度雷公藤或漢防己，以檢測其影響。

二、中藥製備

雷公藤來源有兩處，一取自中國大陸湖北省黃石藥廠錠劑 (33 μ g 純化物/顆)，一由國防醫學院藥學系林漢欽，張溫良副教授由台產植物中純化。中藥將先以酒精 (二毫克/毫升) 溶解後，再用 RPMI 1640 組織培養液稀釋為所需的濃度酒精最後濃度 (0.5%) 已知不致對細胞功能造成傷害。

三、中藥對細胞活性的影響

中藥對細胞活性的影響將在培養末期以 0.5% trypan blue exclusion 法來監測。過去實驗已知雷公藤濃度在 5 毫克/毫升以下，漢防己濃度在 10 μ g/毫升以下對細胞 (滑膜，軟骨細胞) 並不致產生毒性。在先前實驗中，我們也用 acridine orange 和 ethidium bromide (AO/EB) 螢光染色液來辨視細胞活性是否受到中藥影響，在螢光顯微鏡 (450/490nm) 下，雷公藤濃度 0.05 μ g/毫升皆對細胞活性不生影響。因此本實驗中我們使用的濃度皆以此結果為上限。

四、中藥與細胞增生影響

本實驗中我們將選用雷公藤濃度 5ng/mL，500pg/mL，50pg/mL 和與滑膜細胞及軟骨細胞培養 0，0.5，1，2，4，8，24，48，72 小時，並同時加入第一介白質 (1ng/mL)，以觀察中藥對細胞增生的影響，培養中同時加入 XTT 試劑四小時後，以光譜儀測吸光度 (A_{490-690nm})。

五、以 RT-PCR 半定量 message RNA (mRNA)

在 100-mm 盤中細胞的全部 RNA 以 QIAGEN RNA mini kit 分離出，再以 3 μ g 之 total RNA 進行互補 DNA (cDNA) 的合成，再以聚合酶連鎖反應加以測量分析細胞中細胞激素 IL-12 p35、IL-12 p40、IL-12 p70 和 IL-23 p19 之 mRNA 的表現量。另人類 GAPDH, 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' (sense; 213-235 bp) 和 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' (anti-sense; 786-809 bp) 作為其內控制 (internal control)，再以 1% 洋菜洋菜膠體電泳並以 ethidium bromide 染色分析 PCR 產物，最後以 densitometric scanning 定量訊號強度與 GAPDH 比較以作為定量之依據。

六、動物模式

雄性 DBA/1 小鼠在 6-8 週大時約 20g 以免疫法誘發其關節炎。4mg/mL Collagen II from bovine tracheal cartilage 溶於 0.05N 的醋酸中並與 Freund's complete adjuvant 以等體積 (1:1) 的混合，之後在小鼠尾部皮內注射此溶液 (100 μ L)，並於注射後的第 21 天再注射一次 (100 μ L)-4mg/mL Collagen II from bovine tracheal cartilage 溶於 0.05N 的醋酸中並與 Incomplete Freund's Adjuvant 以等體積 (1:1) 的混合。

七、治療

3 隻一組，將以每天以腹腔注射雷公藤。第一組為對照組注射僅生理食鹽水，第二組為對照組注射酒精，第三組腹腔注射雷公藤，第四組不誘發關節炎的老鼠。

八、關節炎評估

老鼠關節炎將由不知實驗設計和分組的研究人員觀察，並每週評分，其給分標準為 0=無關節炎，1=輕微紅腫 (即有些微異常)，2=中度紅腫 (即介於 1-3 之間)，3=嚴重紅腫或變形。

九、以 RT-PCR 半定量 message RNA (mRNA)

我們收集了治療不同時期老鼠的 paw，抽取其 total RNA 以 QIAGEN RNA mini kit 分離出，再以 3 μ g 之 total RNA 進行互補 DNA (cDNA) 的合成，再以聚合酶連鎖反應加以測量分析細胞中細胞激素 IL-1、TNF- α 、IL-12、IL-10 和 IL-4 之 mRNA 的表現量。另以 GAPDH, 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' (sense; 213-235 bp) 和 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' (anti-sense; 786-809 bp) 作為其內控制 (internal control)，再以 1% 洋菜洋菜膠體電泳並以

ethidium bromide 染色分析 PCR 產物，最後以 desitmetric scanning 定量訊號強度與 GAPDH 比較以作為定量之依據。

十、免疫組織染色

我們收集了治療不同時期老鼠的 paw，切成 1 至 1.5 公分後的組織塊，在凍切片機內急速冷凍後，再切成 6-9 μ m 的組織切片，經附著於玻後，再以冰丙酮固定後，以 MMP-3 抗體於 37°C 中 30-60 分鐘，再以其標明的第二抗體作用，之後在顯微鏡中觀其呈色變化。

參、結果

一、雷公藤對細胞活性的影響

我們將滑膜細胞和軟骨細胞以不同濃度的雷公藤和加入或不加入 1ng/mL IL-1 α 處理至 24 小時，再以 XTT 試組加以分析測量細胞活性。結果發現不謂是否有加入 IL-1 α 加以培養的細胞對於其軟骨細胞和滑膜細胞的活性皆不產生影響；且雷公藤在 5ng/mL 濃度以下處理 24 小時對於滑膜細胞和軟骨細胞的活性不產生影響 (Fig.1 and Fig.2)。

二、IL-1 α 誘發 IL-12 family 基因 IL-23 p19 基因之表現

IL-23 為近來被發現之細胞激素，其被歸類於 IL-12 family 之一，IL-23 為一 heterodimer protein，其是一 IL-23 p19 subunit 和 IL-12 p40 subunit 結合的一蛋白質，而在我們以 IL-1 α 去誘導滑膜細胞，其 IL-12p35 subunit 表現量並未有明顯的增加，但同屬 IL-12 family 的 IL-23 p19 subunit 會隨著 IL-1 α 量的增加而增加其 mRNA 之表現量。但如在滑膜細胞中不加 IL-1 α ，IL-23 p19mRNA 是不表現的而 IL-12 p35 是持續表現於滑膜細胞之中 (Fig.3)。

且 IL-23 p19 會隨著 IL-1 α 誘發的時間而改變，在 IL-1 α 刺激後的 6 小時 IL-23 P19 開始表現，而表現至 24 小時為最大量。而 IL-12p35 和 p40 則於 IL-1 α 刺激後的 3 小時則開始表現且一直持續表現至 48 小時 (Fig.4)。

三、IL-1 α 可透過 NF- κ B 和 AP-1 之訊號誘發 IL-23 p19 基因之表現

利用 NF- κ B 和 AP-1 之抑制劑 PDTC 和 curcumin 由 6.25 μ M 至 50 μ M 劑量在加入細胞之中於 IL-1 α 刺激前的一個小時，結果發現隨著抑制劑量的增加而 IL-23 p19 mRNA 的表現量降低，在 50 μ M 的 curcumin 加入可完全抑制由 1ng/mL 之 IL-1 α 刺激所產生的 IL-23 p19 mRNA (Fig.5 and Fig.6)。

四、雷公藤對於細胞激素 IL-12 mRNA 基因的表現之影響

可發現在此二細胞中同時在加入了雷公藤去處理細胞，結果亦未影響到 IL-12p35 subunit 其 mRNA 的表現量。但對於 IL-23 p19 mRNA 則會隨著雷公藤量的增加而降低產生，同時我們利用 Western 方法觀

測其 protein 的改變，發現雷公藤同時抑制了 IL-23 p19 protein 的產生 (Fig.7)。

五、雷公藤抑制軟骨細胞中由 IL-1 α 刺激所產生 MMP-13 mRNA 基因的表現

當 MMP-13 在關節中產生會促使軟骨中的 type II collagen 的剪切與破壞，而雷公藤可抑制軟骨細胞中由 IL-1 α 刺激所產生 MMP-13 mRNA 基因的表現，而在我們從類風濕性關節炎中所取得的滑膜細胞 (Fig.8)。

六、雷公藤抑制在滑膜細胞和軟骨細胞中由 IL-1 α 刺激所產生的 IL-1 α 和 IL-8 mRNA 基因的表現

而在類風濕性關節炎中所表現的發炎性細胞激素 IL-1b 和趨化因子 IL-8，在正常的軟骨細胞和病人的滑膜細胞中皆可由 IL-1 α 的誘導而大量產生 mRNA 的表現，而在雷公藤的加入之後 IL-1b 和 IL-8mRNA 的產生可被抑制 (Fig.9 and Fig.10)。

七、雷公藤可消除由 Collagen II 所誘發產生之老鼠關節炎模式之關節腫脹

我們利用 collagen II 去建立小鼠的動物模式，且於發病之後每天以 IP 注射中藥，結果發現雷公藤可明顯消除小鼠發病後腿的腫脹情況 (Fig.11)。

肆、討論

雷公藤在臨床上用於治療類風濕性關節炎和其他的自體疾病已有很好的療效。因其在抑制發炎的效果是十分的顯著的，但雷公藤作用的機制目前並未非常的清楚。因此我們首先就其基因層次進行研究，在我們先前的研究之中已知，在長期處理雷公藤的滑膜和軟骨細胞並不會改變其基因多形性，也就是說其在細胞激素基因中並不會造成其點的突變 (point mutation)。且已知雷公藤在抑制在發炎性關節炎中扮演重要的抑制者的角色，因在關節炎的研究中已知 MMP-3 和 MMP-1 的表現會造成關節的破壞，而在正常的關節腔中 MMP-3 和 TIMP-1 是維持一定比例的平衡，而在類風濕性關節炎病人的關節腔的關節液其 MMP-3 會大量的增加因而與 TIMP-1 之間失去平衡，則造成了關節的破壞；而在我們的研究中發現雷公藤可以抑制由 IL-1 α 所誘導在滑膜和軟骨細胞中所產生的 MMP-3，因此具有調節 MMP-3 和 TIMP-1 之間的平衡機制，進而具有保護關節的功效。

因近來發現了一新之細胞激素 IL-23，其被歸為 IL-12 family，IL-23 為一 heterodimer protein，其一為 IL-23 P19subunit 另一為 IL-12 P40 subunit，同時 IL-23 和類風濕性關節炎有極大的相關性，因在之前文獻提到，IL-23 會促進關節炎的發炎狀態在關節炎的老鼠中。

在目前的關節炎中的研究中發現，其在發病時其關節腔中的一些發炎性細胞激素會大量的產生如：IL-1、TNF- α 、IL-6 等。同時 IL-1 和 TNF- α 在其類風濕性關節炎的病程中扮演著重要的破壞者的角色，因其會誘發基底蛋白酶 Matrix metalloproteinase 的大量產生。因此在我們的實驗中其選用了 IL-1 α 作為刺激細胞的主要細胞激素，進而測試雷公藤其在軟骨和滑膜細胞中的影響。

IL-1 α 能夠誘發出發炎性細胞激素 IL-1 β 和趨化因子 IL-8 的基因表現；同時發現雷公藤能夠明顯的抑制此二細胞激素的產生，同時 IL-1 α 能透過 NF- κ B 和 AP-1 之訊息途徑去誘發 IL-23 P19 的產生，且雷公藤可明顯的抑制 IL-23 P19 的產生，此一結果可說明雷公藤對於治療 RA 的可能作用機制。

伍、結論與建議

IL-23 為最近被發現之一新的細胞激素，而在其他的研究之中指出 IL-23 在 RA 關節炎之後期扮演著促進發炎的角色，而在我們的研究之中發現從關節炎病人所取出的滑膜細胞經由 IL-1 刺激下產生大量的 IL-23 p19 而中藥—雷公藤可以明顯抑制它的產生，此一為新發現用來證明雷公藤用來治療類風濕性關節炎之可能作用機制。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-103 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H. et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 341-51.
2. Van Zeben D, Hazes JMW, Zwinderman AH, Cats A, Schreuder GMT, D'Amaro J, et al. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a followup study. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 822-30.
3. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 1989; 36: 178-82.
4. Lipsky PE and Tao XL. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 713-723.
5. Gu WZ, Banerjee S, Rauch J, Brandwein SR, Suppression of renal disease and arthritis, and prolongation of survival in MRL-lpr mice treated with an extract of *Tripterygium Wilfordii* Hook F. *Arthritis Rheum* 1992; 35(11): 1381-6.
6. Zhang XY, Tsuchiya N, Yamamoto K, Ishihara K, Okudaira H, Ito K, Miyamoto T. Prolonged survival in MRL-lpr mice treated with *Tripterygium Wilfordii* Hook-F. *Clin Immunol Immunopathol* 62(lpt 1): 66-71, 1992.
7. Chang DM, Chang WY, Kuo SY, Chang ML. The effects of traditional anti-rheumatic herbal medicines on immune response cells. *J Rheumatol* 1997; 24: 23-6.
8. Lai JH, Ho LJ, Lu KC, Chang DM, Shaio MF, and Han SH. Western and Chinese anti-rheumatic drug-induced T cell apoptotic DNA damage uses different caspase cascades and is independent of Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 2001; 166: 6914-24.
9. Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Dehnade F, and Zafarullah M. *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-kB activities. *Molecular Pathology* 2001; 59: 1196-1205.
10. Tao XL, Schulze-Koops H, Ma L, Cai J, Mao Y and Lipsky PE. Effects of

- Tripterygium wilfordii hook F extracts on induction of cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E2 production. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 130-138.
11. Whitehouse MW, Fairlie DP, and Throng YH. Anti-inflammatory activity of the isoquinoline alkaloid, tetradrine, against established adjuvant arthritis in rats. *Agents Actions* 1994; 42: 123.
 12. Chen F, Sun S, Kuhn DC, Lu Y, Gaydos LJ, Shi X, and Demers LM. Tetradrine inhibits signal-induced NF-KB activation in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1997; 231: 99.
 13. Li QL, Xu YH, Zhon ZH, Chen XW, Huang XG, Chen SL, and Zhan CX. The therapeutic effect of tetradrine on silicosis. *Chin J Tuberc Respir Dis* 1981; 4: 32.
 14. Lai JH, Ho LJ, Kwan CY, Chang DM, and Lee TC. Plant alkaloid tetradrine and its analog block CD28-stimulated activities of human peripheral blood T cells: Potential immunosuppressants in transplantation immunology. *Transplantation* 1999; 68: 1383.
 15. Arend W. Interleukin-1 receptor antagonist: a new member of the interleukin-1 family. *J Clin Invest* 1991; 5: 1445-51.
 16. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1a and IL-1b loci. *Genomics* 1992; 13: 654-7.
 17. Di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1b gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 450.
 18. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism at -511 in the human interleukin-1b gene correlates with IL-1b secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396-402.
 19. Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86 base pair tandem repeat. *Hum Genet* 1993; 91: 403-4.
 20. Miossec P, Naviliat M, Dupuy d'Angeac A, Sany J, Banchereau J. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor b in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1180-7.

21. Le Beau MM, Lemons RS, Espinosa R, Larson RA, Arai N, Rowley JD. Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del (5q). *Blood* 1989; 73: 647-50.
22. Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. Interleukin-10 functions as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 386-95.
23. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
24. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Howell DS and Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-685.
25. Yoshihara Y, Obata K, Fujimoto N, Yamashita K, Hayakawa T and Shimmei M. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 969-975.
26. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM and David cs. Type II collagen induced arthritis in mice 1. Major histo compatibility complex (I-region) linbage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981, 154: 1688-700.

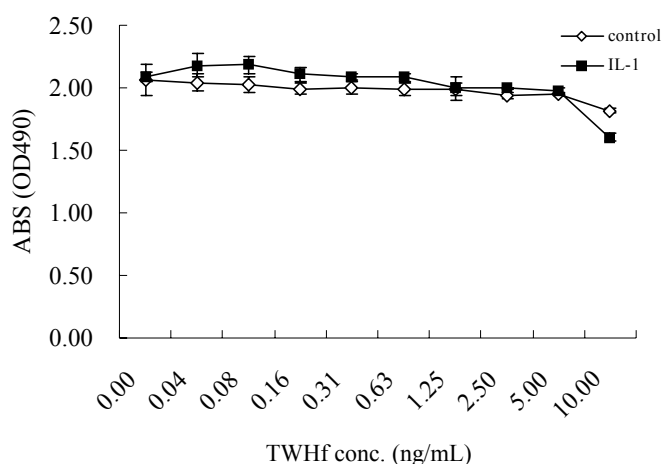


Fig.1 Effects of TWHf extract on the cell viability of human fibroblast-like synoviocytes-RA(HFLS-RA). 4×10^3 HFLS-RA at 8 passage in 96-well plates were treated with or without various concentrations of TWHf in 200 ul Dulbecco's modified Eagle's medium/0.2 LAH for 24 hours, and then incubated with the XTT reagent, precipitate solubilized, and subjected to spectrophotometry. Data are the mean SD of triplicate determinations for each treatment.

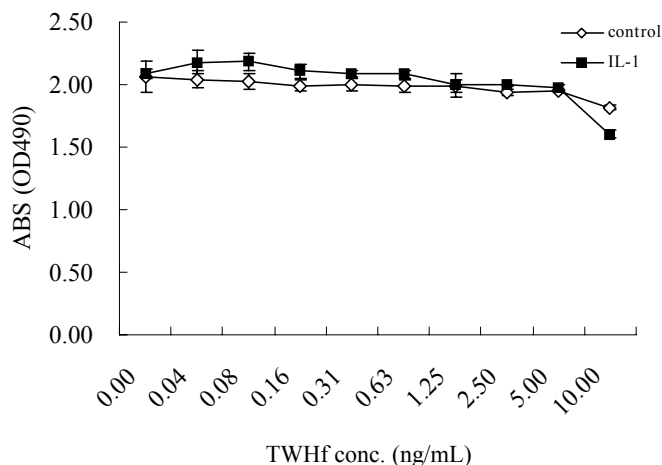


Fig.2 Effects of TWHf extract on the cell viability of human chondrocytes. 4×10^3 chondrocytes at 8 passage in 96-well plates were treated with or without various concentrations of TWHf in 200µL Dulbecco's modified Eagle's medium/ 0.2% LAH for 24 hours, and then incubated with the XTT reagent, precipitate solubilized, and subjected to spectrophotometry. Data are the mean SD of triplicate determinations for each treatment inations for each treatment.

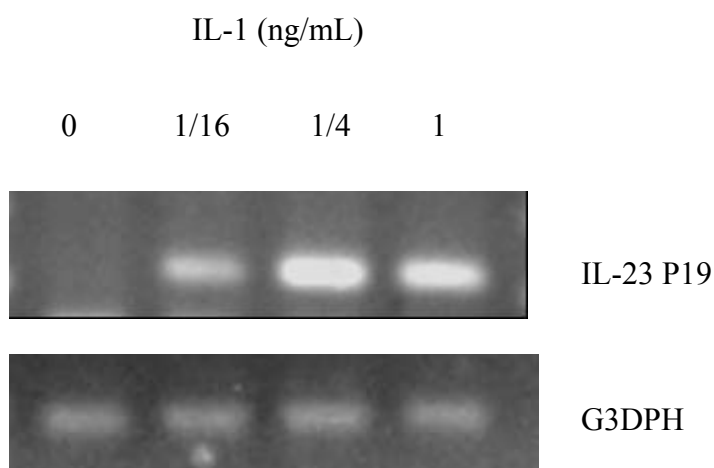


Fig.3 Dose dependence of IL-1 α -stimulated IL-23 p19 gene expression in HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free- modified Eagle's medium) were cultured for 18 hours with various concentrations of IL-1 α (0ng/mL, 1/16ng/mL, 1/4ng/mL and 1ng/mL), and IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantative RT-PCR. Similar results were obtained in 4 experiments with cells from different RA patients.

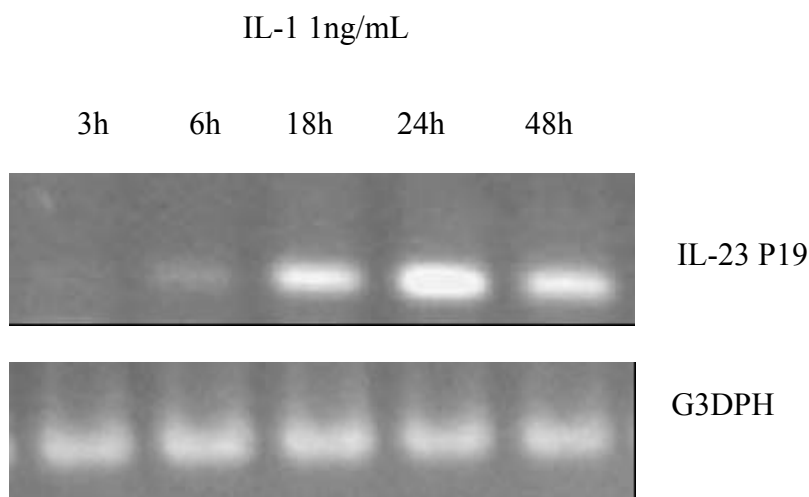


Fig.4 Time course of IL-1 α -stimulated IL-23 p19 gene expression in HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free-modified Eagle's medium) were cultured with IL-1 α 1ng/mL for 3 hours, 6 hours, 18 hours, 24 hours and 48 hours, and IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantative RT-PCR. Similar results were obtained in 4 experiments with cells from different RA patients.

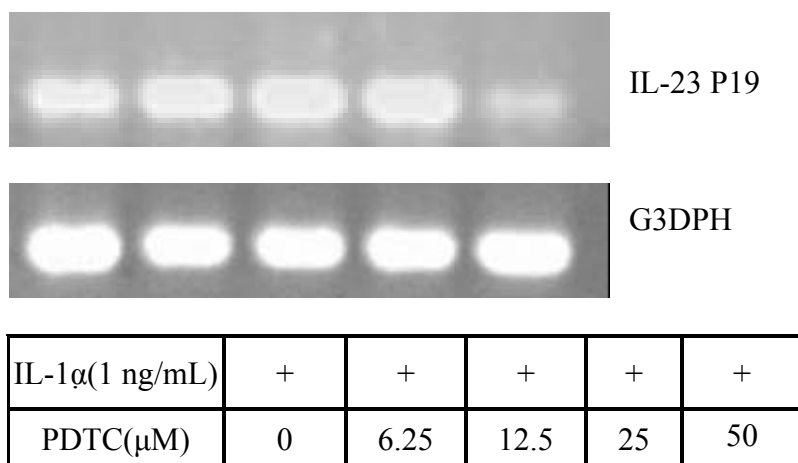


Fig.5 PDTC down-regulates IL-23 P19 mRNA expression in IL-1 α -stimulated HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free-modified Eagle's medium) were pre-treated with various concentrations of PDTC (0, 6.25, 12.5, 25 and 50 μ M) for 1 hour, then treated with IL-1 α for 18 hours. IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR.

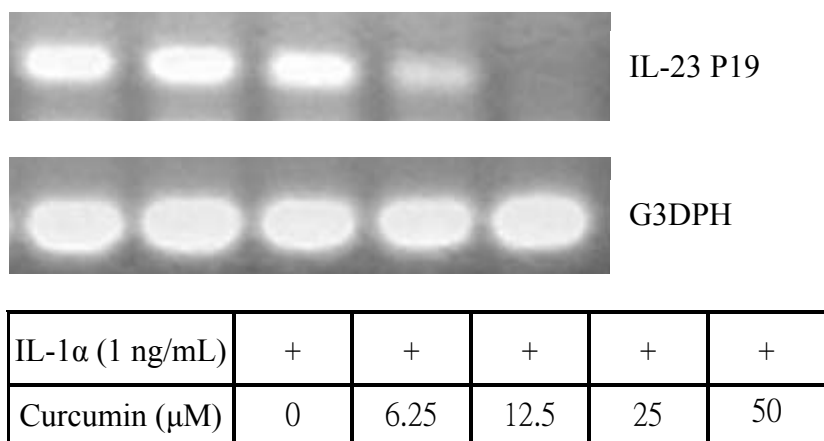
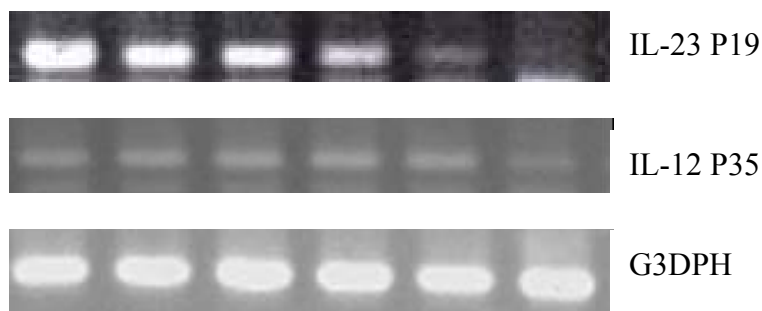


Fig.6 Curcumin down-regulates IL-23 P19 mRNA expression in IL-1 α -stimulated HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free-modified Eagle's medium) were pre-treated with various concentrations of curcumin (0, 10, 25 and 50 μ M) for 1 hour, then treated with IL-1 α for 18 hours. IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR.



IL-1 α (1 ng/mL)	+	+	+	+	+	-
TWHf (ng/mL)	0	0.3	0.6	1.3	2.5	0

Fig.7 TWHf down-regulates IL-23 p19 mRNA expression in IL-1 α stimulated HFLS-RA, but no effects on IL-12 p35 mRNA expression . HFLS-RA were treated with 1ng/mL IL-1 and different concentration of TWHf (0, 0.3, 0.6, 1.3 and 2.5 ng/mL) for 18 hours d IL-23 p19. Total RNA was extracted and gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR. The results are representative of three different RA patients with comparable results.

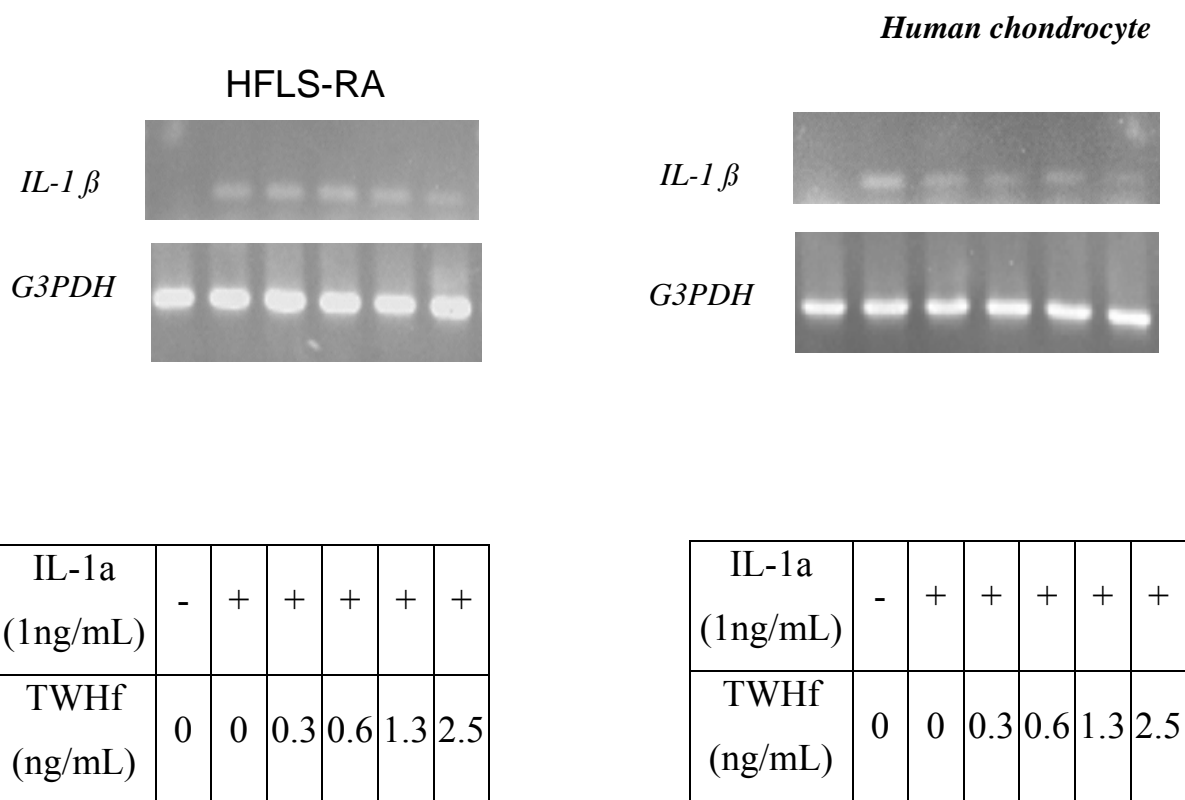


Fig.8 Inhibition of IL-1 α -induced IL-1 β gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10 mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of IL-1 β .

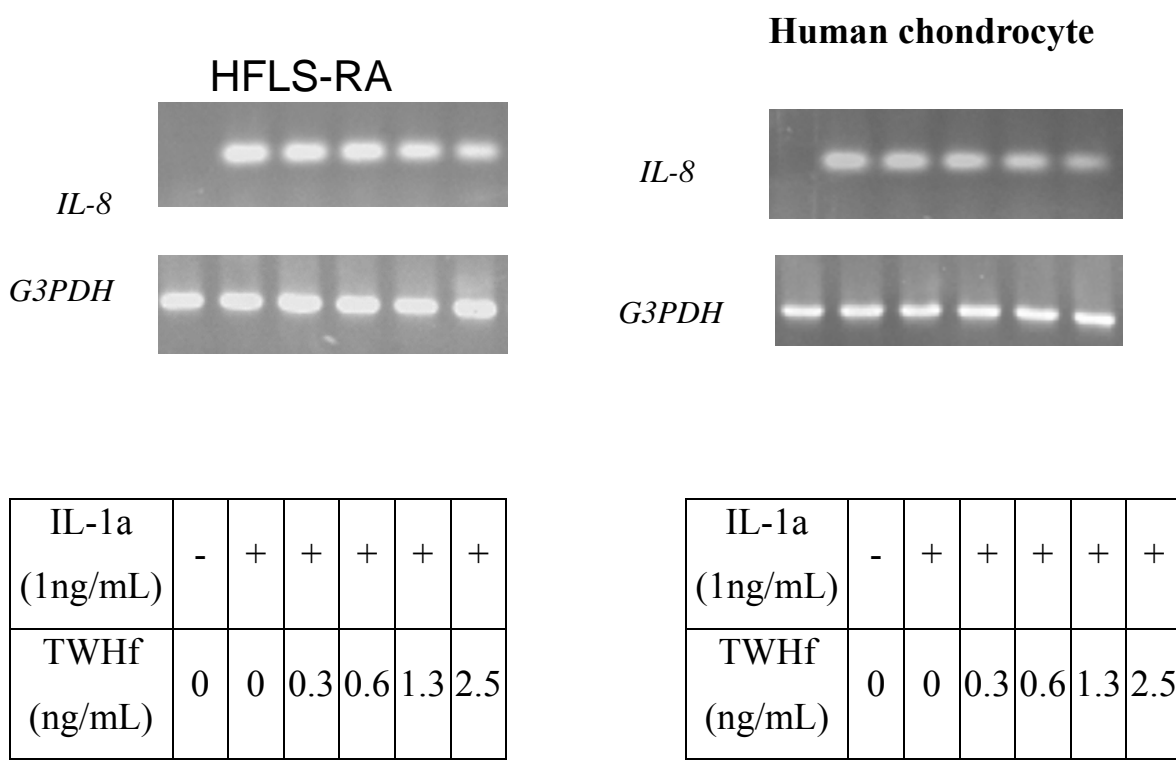


Fig.9 Inhibition of IL- α -induced IL-8 gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10 mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of IL-8.

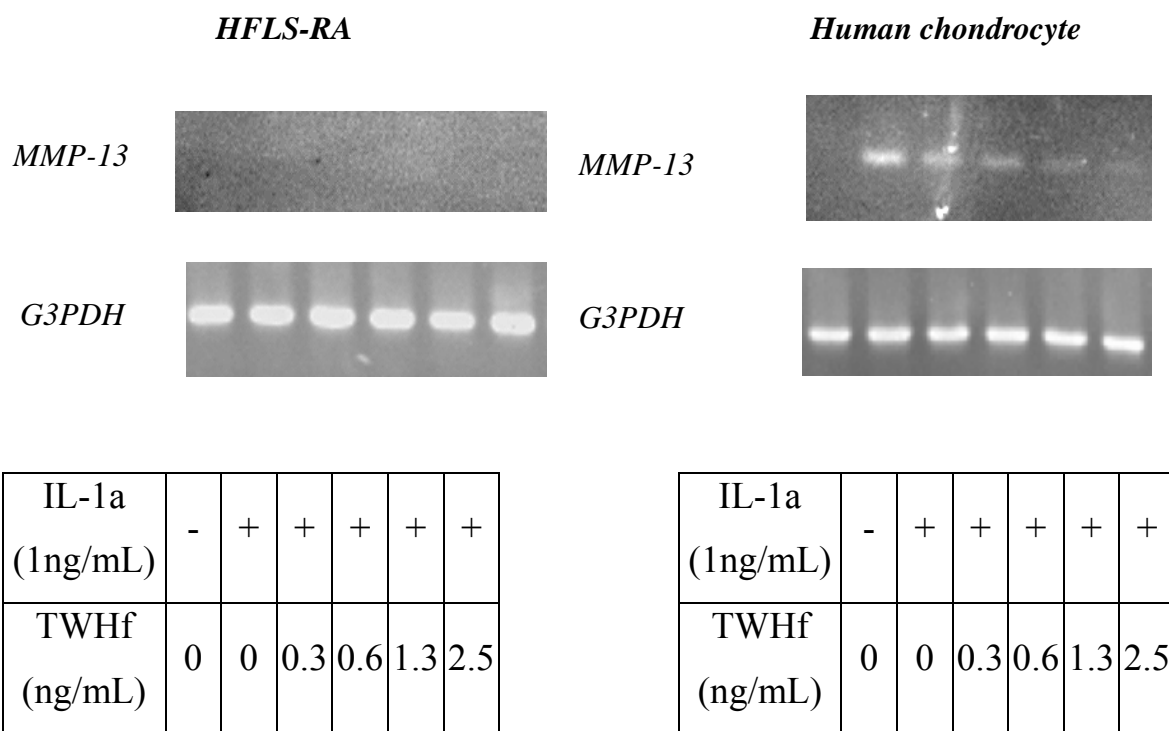


Fig.10 Inhibition of IL-1 α -induced MMP-13 gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of MMP-13.

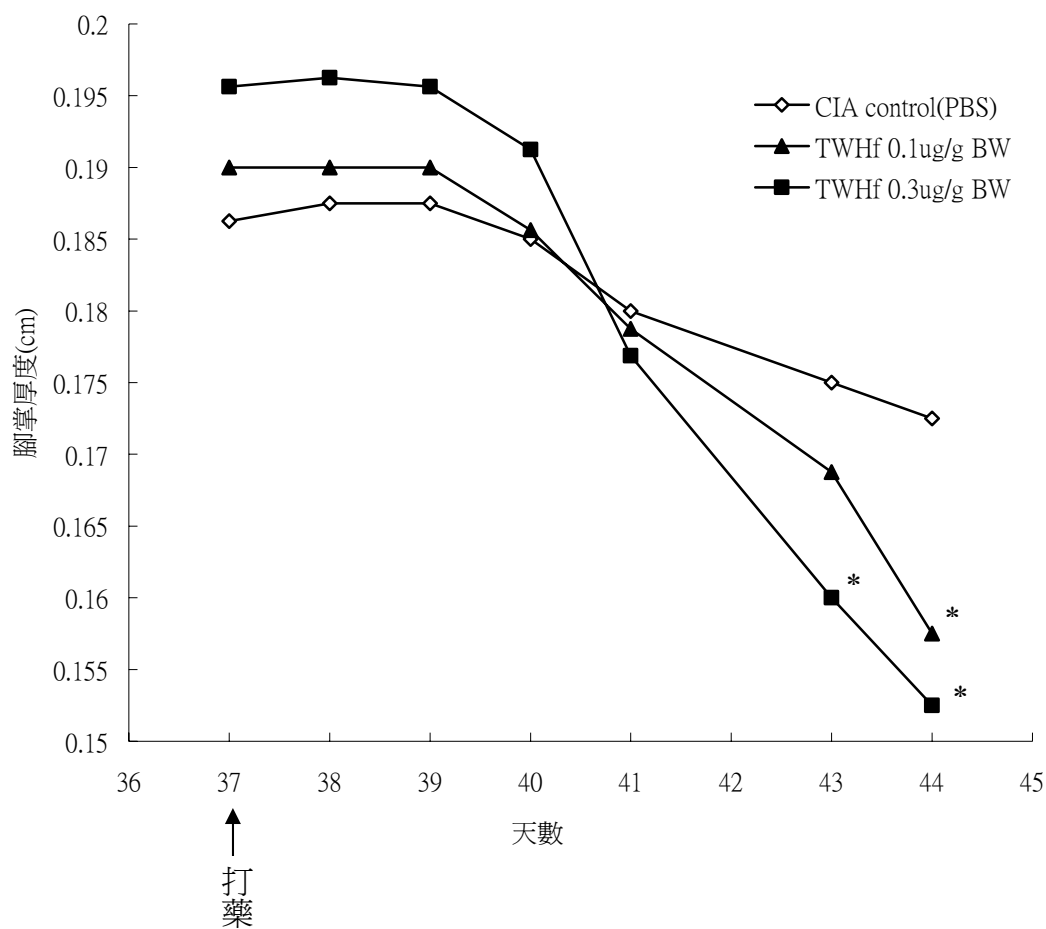


Fig.11 Therapeutic administration of TWHf reduces the severity of CIA. DBA/1 mice immunized on day 0 and boosted on day 21 with type II collagen were administered vehicle (PBS/enthol) or TWHf at 0.1 or 0.3mg/kg, i.p, from 38 days. Histograms demonstrate the mean densitometric intensity (\pm SD) as assessed in four separate experiments. (* $P < 0.05$ versus CIA control)