

編號：DOH91-TD-1157、CCMP92-RD-113、CCMP93-RD-103

中藥调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總報告

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。

首先我們收集類風濕性關節炎置換之關節滑膜，以雷公藤長期處理，並分析其細胞激素基因之基因形。且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，分析 ELISA 法分析其 MMP-3 和 TIMP-1 之表現變化，同時分析細胞中之細胞激素基因 (IL-1 β 、IL-12 p35 和 IL-23 p19)、趨化激素 (IL-8) 和 MMP-13 表現量改變-以 RT-PCR 的方式分析，且同時以 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。

發現長期處理雷公藤的細胞並未影響其細胞激素基因之基因多形性，並在經由低濃度的雷公藤處理的細胞即能明顯抑制由 IL-1 刺激下所產生 MMP-3 蛋白質，且雷公藤對於 tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) 的產生並不影響；所以雷公藤能抑制 MMP-3 產量且改善 MMP-3/TIMP-1 之比值；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: DOH91-TD-1157、CCMP92-RD-113、CCMP93-RD-103

Regulation of Cytokine Gene Polymorphisms by Herbal Medicine Affects the Susceptibility and Severity of Rheumatoid Arthritis

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).

Synovial fibroblasts and chondrocytes have been used as the target cells on account of their predominant roles in RA. At first, we tested the effects of TWHf on cytokines gene polymorphism and IL-1 mediated MMP-3 and TIMP-1 production. Human chondrocyte and RA patient's synovial fibroblasts were incubated with 1ng/mL IL-1 and different concentrations of TWHf for 16 hours. Secondly, we tested the effects of TWHf on cytokine genes (IL-1 β) and chemokine gene (IL-8) and MMP-13 gene expression from both fibroblast and chondrocyte cells. 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. At last, use animal model of RA determine the function of TWHf in therapy.

We found TWHf could not influence cytokines gene polymorphism. And

TWHf could inhibit the IL-1 α -induced production of MMP-3 in both synovial and chondrocyte cells, but it did not effect TIMP-1 production. In contract, TWHf could change the ratio of MMP-3:TIMP-1 on synovial and chondrocyte cells stimulated with IL-1 α . In addition, 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，因此細胞激素之多形基因排列 (polymorphic gene sequences) 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，首推雷公藤和漢防己甲素在動物和人體的實驗中最為明瞭。雖然這兩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⁾。

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。

第四介白質為一具有抗發炎效應的細胞激素，唯在類風濕性關節炎滑膜組織其產製則明顯減少或消失⁽²⁰⁾。第四介白質的基因已被圖記至第五對染色體的 q 臂 (q23-31)⁽²¹⁾。

第十介白質主要由巨噬細胞，單核細胞，和淋巴球分泌，和第四介白質相同皆具有抗發炎的作用。此細胞激素由滑膜組織合成，但其產量顯然無法完全抑制因第一介白質及腫瘤壞死因子所產生的發炎反應⁽²²⁾。研究已知在啟動區之-1082 位置出現單 bp 的替代者 A 與 T 細胞受刺激後產生低量第十介白質有相關性⁽²³⁾。

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。

在此一參年的研究計畫中，我們主要將研究至少 6 個基因多形性 (gene polymorphisms)，二個為第一介白質基因，1 個為第一介白質抑制蛋白基因，1 為第十介白質基因，另二個為第四介白質基因，我們的目的是在測試這些基因多形性的變化，是否可為類風濕性關節炎疾病感受性或嚴重度的標記，第一、二年中我們將比較類風濕性關節炎與正常(或退化性關節炎)者滑膜及軟骨細胞中這些細胞激素基因多形性的差異，再用不同濃度的中藥(雷公藤)測試其對兩種來源細胞中基因表現的影響；第三年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，及比較有無反應或強弱反應間上述細胞激素基因表現的差異。

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

一、滑膜細胞

滑膜組織將分別取自健康正常人因外傷接受關節手術而取得類滑膜纖維母細胞 (cell system, kirkland, WA)，以及類風濕性關節炎患者接受關節置換術時取得。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，以檢測其影響。

二、軟骨細胞

以同樣方法取得或購入人類軟骨細胞。由手術中取得的軟骨組織將用酵素分解，先用 trypsin (0.25%) 15分鐘再用 hyaluronidase (0.1%) 30分鐘，最後再加0.06% collagenase in DMEM 15小時，並加以振盪。分離的細胞將先洗清，在48孔培養盤中置入 5×10^4 細胞/cm² 及 0.5 mL DMEM (Eulbecco's Modified Eagle Media, Gibco) 並加入10%胎牛血清。大約7-10天，細胞會長成一層而可提供為實驗用。

三、中藥製備

雷公藤來源取自中國大陸湖北省黃石藥廠錠劑 (33 μ g 純化物/顆)。部份中藥將先以酒精 (2毫克/毫升) 溶解後，再用 DMEM 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。

四、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/毫升及漢防己濃度在10 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。

五、確定細胞激素對偶質多形性 (allelic polymorphisms)

本實驗將使用聚合酶鏈狀反應 (PCR) 及 DNA 微陣列 Microarray 方法來確認不同細胞激素的基因型。每一多形性分析的細節列於表一及表二。當使用聚合酶鏈狀反應分析時，測第一介白質接受體抑制蛋白 intron 2 和第四介白質 intron 3 多形性表現，鏈狀反應的產物包括 VNTR，將直接用 agarose 凝膠電泳法分析。每一對偶質則以其大小辨識。

第一介白質 promoter 位於-511 位的多形性則先以聚合酶鏈狀反應強化後分析，再用 Ava 分解後以 RFLP 分析。

在第一介白質基因 exon5 內之多形性表現區先強化後，其聚合酶鏈狀反應的產物再以 Tag I RFLP 研究。第四介白質 promoter 的多形性基因表現則在以 sm F1 分解後再研究。以上這五種多形性變化，無論是聚合酶鏈狀反應的產物或分解的片段，則皆以 agarose 凝膠電泳分析法再染以 ethidium bromide 分析。

Agarose 凝膠的濃度和 DNA 分子量標記則依預判之 DNA 產物大小決定。在第十介白質 promoter 位於-1082 的多形性基因表現以 SSOP 技術分析。經強化訊號後，聚合酶鏈狀反應產物將轉印在 nylon 膜上再 hybridized 到 ^{32}P -標記之 SSOP: 5'-TTTGGGAGGGGGAAGTAGG G-3' 用於第十介白質-1082G 偶質，而 5'-TTTGGGAAGGGGGAAGTAG GG-3' 用於第十介白質-1082 A 偶質。Probes 將於 42.5°C hybridized，膜於 60°C 洗淨，並以 autoradiography 獲得結果。

六、中藥與細胞增生影響

本實驗中我們將選用雷公藤濃度 $5\mu\text{g/mL}$ ， 500pg/mL ， 50pg/mL 和漢防己甲素濃度 $10\mu\text{g/mL}$ ， $1\mu\text{g/mL}$ ， $100\mu\text{g/mL}$ ， $10\mu\text{g/mL}$ ， $1\mu\text{g/mL}$ 與滑膜細胞及軟骨細胞培養 0，0.5，1，2，4，8，24，48，72，96，120，144，168 小時，並同時加入第一介白質 ($1\mu\text{g/mL}$)，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 ($A_{490-690\text{nm}}$)。

七、以酵素免疫分析 (ELISA) MMP-1、MMP-3 和 TIMP

上列培養的上清液收集，使用酵素免疫分析法測量其中 MMP-1、MMP-3 和 TIMP 的含量 (R&D)，並計算 MMP-1、MMP-3 和 TIMP 的比率。

八、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-1、IL-4、IL-10 和 TNF- α 之 mRNA 的表現量。另人類 GAPDH, 5'-CCACCCATGGC AAATTCATGGCA-3' (sense; 213-235 bp) 和 5'-TCTAGACGGCAG GTCAGGTCCACC-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 desitometric scanning 定量訊號強度與 GAPDH 比較以作為定量之依據。

九、中藥與第一介白質協同作用對細胞活性的影響

滑膜及軟骨細以定濃度中藥抑制，加或不加入第一介白質再以微陣列分析。

十、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。

十一、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。

十二、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。

十三、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。

十四、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，經附著於玻片後，再以冰丙酮固定後，以 MMP-3 抗體於 37 $^{\circ}$ 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、細胞基因多形性分析

我們將經雷公藤培養的細胞—滑膜和軟骨細胞，經收集之後分離其 Genomic DNA 進行基因多形性分析，發現滑膜細胞不管是否有經過雷公藤與 IL-1 α 長期處理下其在 IL-1 β promoter 於-511 位置皆是 C/T，IL-1 β Exon 是 E1/E1 型，IL-1Ra 為 Type I/Type III，IL-4 intron3 為 Type RP2/Type RP2 並不因雷公藤與 IL-1 α 的作用而改變這些細胞激素基因的多形性 (Table 1)。同樣的在軟骨細胞亦是相同的結果，不因雷公藤與 IL-1 α 的作用而改變這些細胞激素基因的多形性 IL-1 β promoter 於-511 位置是 C/C，IL-1 β Exon 是 E1/E2 型，IL-1Ra 為 Type I/Type I，IL-4 intron3 為 Type RP1/Type RP2 (Table 2)。

三、雷公藤對細胞基因表現之影響

將經由 IL-1 α 處理的滑膜或軟骨細胞，抽取其 RNA 並做上 Cy3 (Green) 標定做為我們的控制組，雷公藤和 IL-1 α 同時處理過之滑膜或軟骨細胞，抽取其 RNA 並做上 Cy5 (Red) 標記，之後進行 cDNA 的生物晶片的檢測。結果發現在滑膜細胞之中其 MMP-3 基因在經過 0.75ng/mL 的雷公藤處理之後其基因的表現明顯的被抑制，所以在晶片上呈現綠色反應 (Fig. 3A)。而在軟骨細胞之中則其 MMP-13 基因在經過 0.75ng/mL 的雷公藤處理之後其基因的表現明顯的被抑制 (Fig.3)。同時在晶片上同時有發現雷公藤明顯抑制 surfactant-pulmonary-associated protein D、phosphate cytidylytransferase 1-choline-beta isoform 和 cyclin B2 等基因之表現，目前，我們正進一步探討這些基因與類風濕關節炎的相關性。

四、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. 4)。

五、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 β 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-1 β 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-1 β 和 IL-8mRNA 的產生可被抑制 (Fig.5 and Fig.6)。

六、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 (Fig. 7)。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。

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 (Fig. 8)。

七、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 (Fig.9)，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.10)。

八、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 (Fig.11)。

九、雷公藤抑制 MMP-3 的表現

目前研究之中已知，在類風濕性關節炎的發炎機制中細胞激素 IL-1 和 TNF- α 在其中扮演著重要的角色；因此在我們的此一研究中我們選用了其中一細胞激素 (IL-1 α 來刺激關節的滑膜和軟骨細胞)。我們將滑膜細胞和軟骨細胞以 1ng/mL IL-1 α 刺激再加上不同濃度的雷公藤培養 16 小時後，收取其細胞培養之上清液，做基底蛋白酶 Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 的 ELISA 測量分析。結果發現當細胞在未加上 1ng/mL IL-1 α 刺激時，則不會產生 MMP-3 於細胞的上清液中。依照細胞活性測試的結果 (Fig.1 and Fig.2)，我們在不影響其細胞的活性狀態下的雷公藤去處理細胞，發現在低濃度的雷公藤處理即能對於由 1ng/mL IL-1 α 刺激產生的 MMP-3 蛋白質有明顯的抑制效果，且會隨著雷公藤的加入量增加而增加其抑制 IL-1 α 所誘導的 MMP-3 在滑膜細胞和軟骨細胞中的產生量 (Fig.12)。而這些 MMP-3 被抑制即可延緩關節炎中的 proteoglycans、collagens、gelatins 和 aggrecan 的 link protein 的破壞，進而減低對關節的損害。

十、雷公藤改善 MMP-3 和 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1) 的不平衡之狀況

因當 MMP-3 增加時，則在關節腔中的 MMP-3 和 TIMP-1 會造成不平衡的現象，而此一不平衡會造成軟骨組織的破壞，而由 Fig. 3 and Fig.4 已知雷公藤所處理過的軟骨和滑膜細胞其明顯的抑制了由 IL-1 α 所誘導產生的 MMP-3 的表現，而在此二細胞之中雷公藤對於此二細胞對於 TIMP-1 的表現並無明顯的影響 (Fig.13)，故能降低其 MMP-3:TIMP-1 的比值，進而改善其不平衡的狀況，而減低發炎中的軟骨的破壞。

十一、雷公藤可消除由 CollagenII 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.14)。

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)；而今年度我們初步的研究結果，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的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 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。

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 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。結果發現 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。但並非全面性的抑制，其在細胞激素 IL-12p35 subunit 並無抑制效果，而過去的研究中指出在關節炎中一直以為扮演著促發炎角色的細胞激素 IL-12，在最近的文獻中推翻了先前的結果，發現其在類風濕性關節炎中確是有保護的效果。因近來發現了一新細胞激素 IL-23，其被歸為 IL-12 family，IL-23 為一 heterodimer protein，其一為 IL-23 P19 subunit 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。我們發現 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-23P19 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。此為一新發現，因此雷公藤在治療類風濕性關節炎的機制是值得由此再深入探討。

伍、結論與建議

就以上的結果我們可推論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，細胞激素以及 MMP-3 是兩個很好的切入點。幸運的，我們已獲得初步的成果，而目前已將結果整理發表。

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(1pt 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.

柒、圖表

Table1 Typing for cytokine polymorphisms. Primary human Fibroblast-Like synoviocyte passage 2nd to 4th treated with or without 0.75ng/mL TWHf and treated with or without 1ng/mL IL-1 for 7 days to 14 days. Then genomic DNA was isolated from cells using QIAGEN genomic DNA isolated kit. PCR was used to identify the genomic pattern of all of the different cytokine genes.

		Fibroblast-Like Synoviocytes			
		Control	IL-1 (1ng/mL)	TWHf (0.75 ng/mL)	IL-1+TWHf
passage 2	IL-1 β promoter genotype	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T
	IL-1 β Exon 5 genotype	E1/E1	E1/E1	E1/E1	E1/E1
	IL-1Ra genotype	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2
passage 3	IL-1 β promoter genotype	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T
	IL-1 β Exon 5 genotype	E1/E1	E1/E1	E1/E1	E1/E1
	IL-1Ra genotype	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2
passage 4	IL-1 β promoter genotype	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T	-511*C/-511*T
	IL-1 β Exon 5 genotype	E1/E1	E1/E1	E1/E1	E1/E1
	IL-1Ra genotype	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III	Type I / Type III
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2	Type RP2/RP2

Table2 Typing for cytokine polymorphisms. Primary human chondrocyte passage 3rd to 5th treated with or without 0.75ng/mL TWHf and treated with or without 1ng/mL IL-1 for 7 days to 14 days. Then genomic DNA was isolated from cells using QIAGEN genomic DNA isolated kit. PCR was used to identify the genomic pattern of all of the different cytokine genes.

		human Chondrocyte			
		Control	IL-1 (1ng/mL)	TWHf (0.75 ng/mL)	IL-1+TWHf
passage 2	IL-1β Exon 5 promoter genotype	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C
	IL-1β Exon 5 genotype	E1/E2	E1/E2	E1/E2	E1/E2
	IL-1Ra genotype	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2
passage 3	IL-1β promoter genotype	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C
	IL-1β Exon 5 genotype	E1/E2	E1/E2	E1/E2	E1/E2
	IL-1Ra genotype	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2
passage 4	IL-1β promoter genotype	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C	-511*C/-511*C
	IL-1β Exon 5 genotype	E1/E2	E1/E2	E1/E2	E1/E2
	IL-1Ra genotype	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I	Type I / Type I
	IL-4 intron 3 genotype	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2	Type RP1/RP2

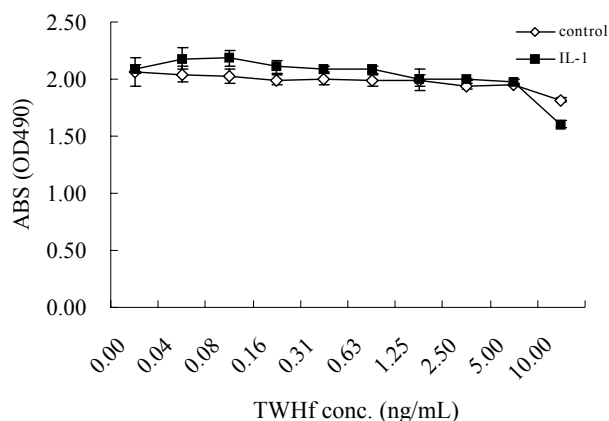


Fig.1 Effects of TWHf extract on the cell viability of human fibroblast-like synoviocytes-RA(HFLS-RA). 4×10^3 HFLS-RA at 8 passage in 96-well plates were treated with or without various concentrations of TWHf in 200 μ L Dulbecco's modified Eagle's medium /0.2 LAH for 24 hours, and then incubated with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

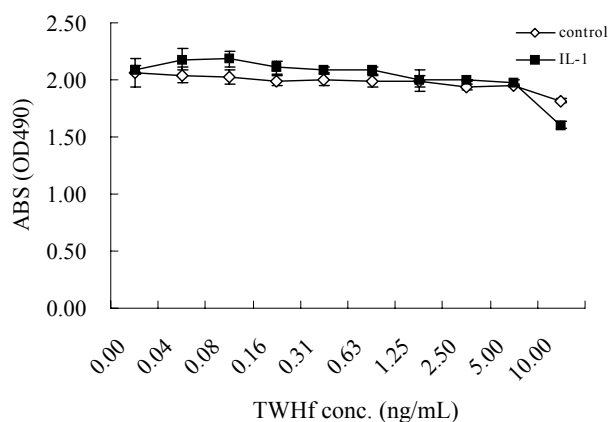


Fig.2 Effects of TWHf extract on the cell viability of human chondrocytes. 4×10^3 chondrocytes at 8 passage in 96-well plates were treated with or without various concentrations of TWHf in 200 μ L Dulbecco's modified Eagle's medium/ 0.2% LAH for 24 hours, and then incubated with the XTT reagent, precipitate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

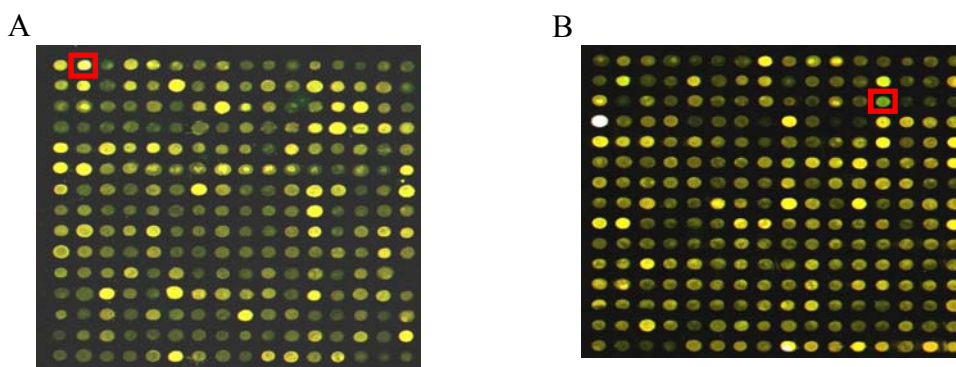


Fig.3 **A. Stromelysin (MMP-3)**

HFLS-RA control (Cy3(Green)): Primary human synoviocyte-RA passage 8th treated with IL-1 ng/mL for 18 hours.

HFLS-RA TWHf (Cy5(Red)): Primary human synoviocyte-RA passage 8th treated with IL-1 ng/mL and TWHf 0.75ng/mL for 18 hours. Total RNA was sample for micro array assay. Total RNA were isolated with QIAGEN RNeasy Kit from HFLS-RA control and HFLS-RA TWHf cells.

B. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)

HC control (Cy3(Green)): Primary human chondrocyte passage 8th treated with IL-1 ng/mL for 18 hours.

HC TWHf (Cy5(Red)): Primary human chondrocyte passage 8th treated with IL-1 ng/mL and TWHf 0.75ng/mL for 18 hours. Total RNA was samples for micro array assay. Total RNA were isolated with QIAGEN RNeasy Kit from HC control and HC TWHf cells.

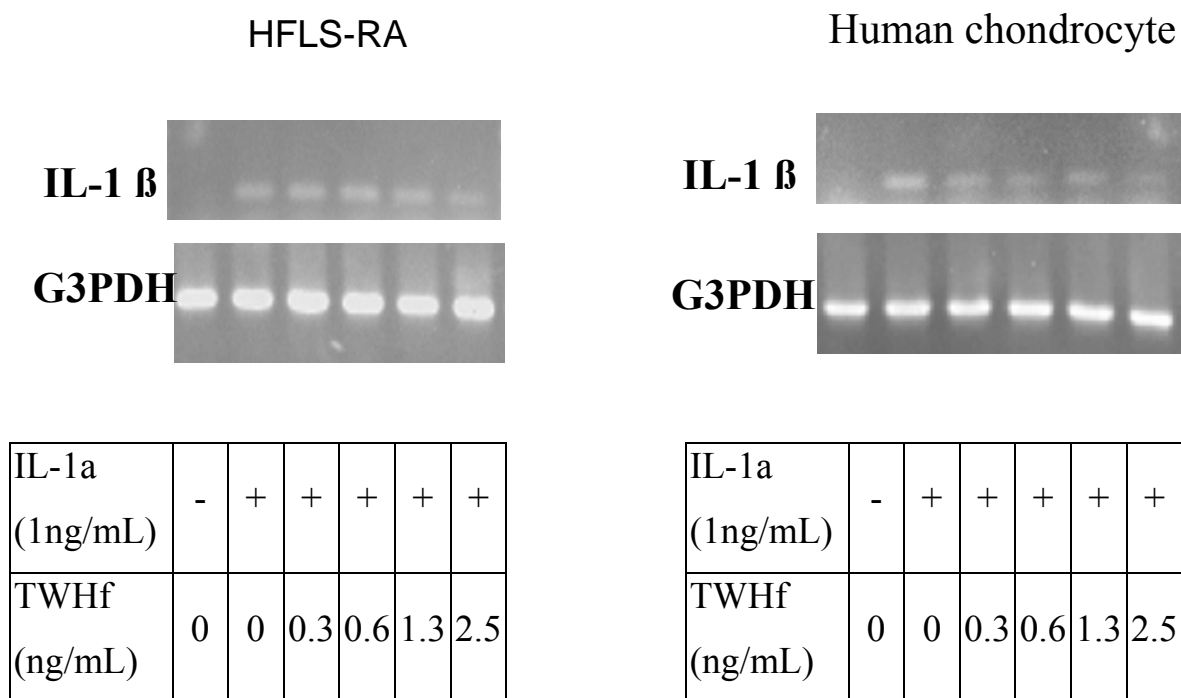


Fig.4 Inhibition of IL-1 α -induced IL-1 β gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10 mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of IL-1 β

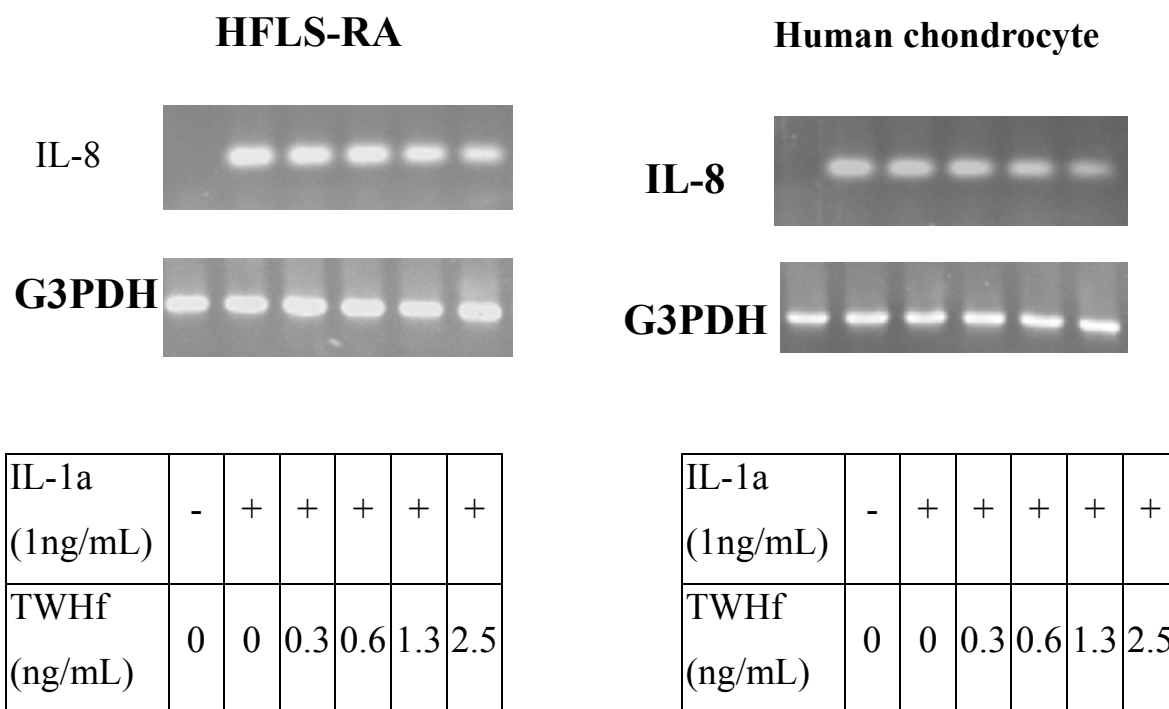


Fig.5 Inhibition of IL- α -induced IL-8 gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10 mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of IL-8.

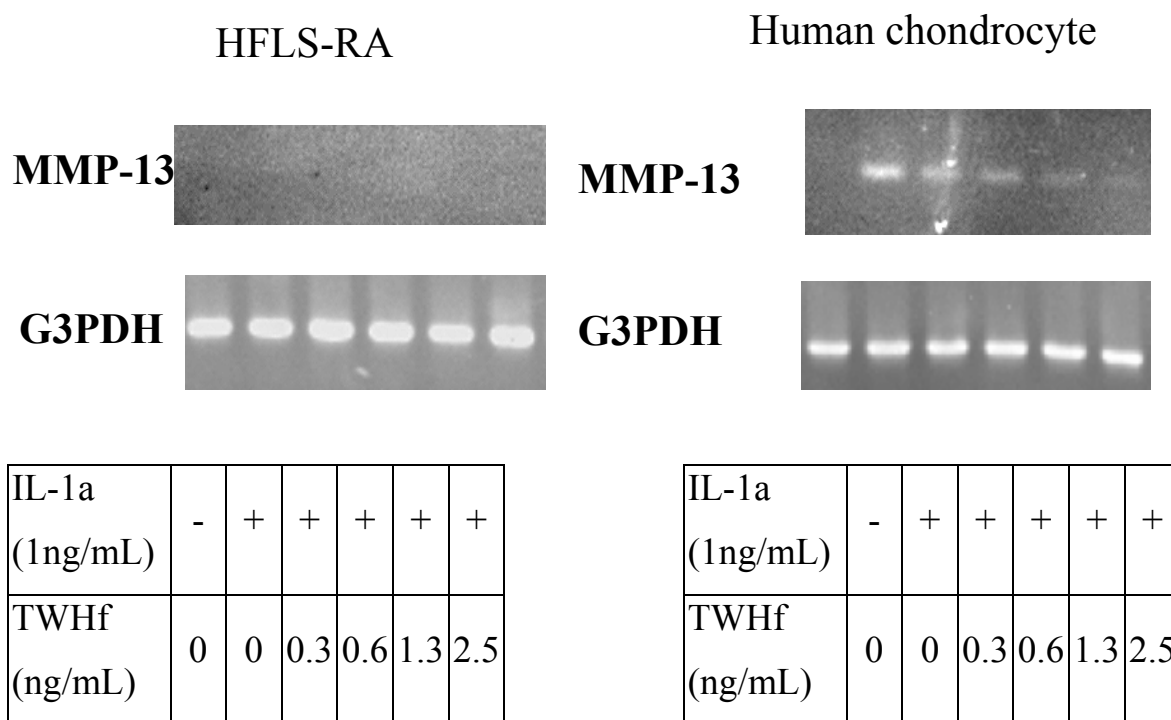


Fig.6 Inhibition of IL-1 α -induced MMP-13 gene expression by TWHf extraction in human human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. HFLS-RA and human chondrocytes in 100-mm dishes were treated with or without IL-1 α (1ng/mL) and with TWHf in 10 mL DMEM/0.2% lactalbumin hydrolysate for 18 hours. Total RNA (1 μ g) were subjected to RT-PCR for mRNA of MMP-13.

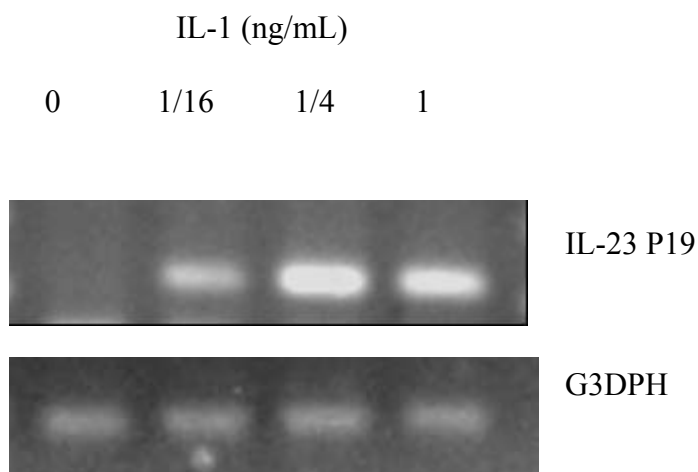


Fig.7 Dose dependence of IL-1 α -stimulated IL-23 p19 gene expression in HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free- modified Eagle's medium) were cultured for 18 hours with various concentrations of IL-1 α (0ng/mL, 1/16ng/mL, 1/4ng/mL and 1ng/mL), and IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR. Similar results were obtained in 4 experiments with cells from different RA patients.

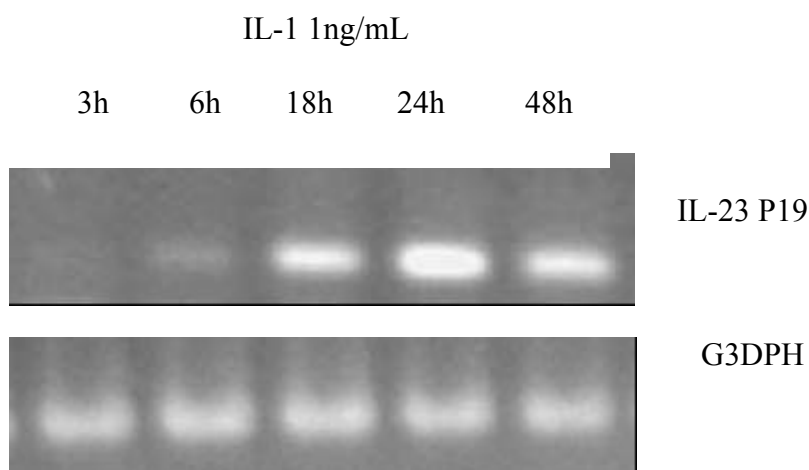
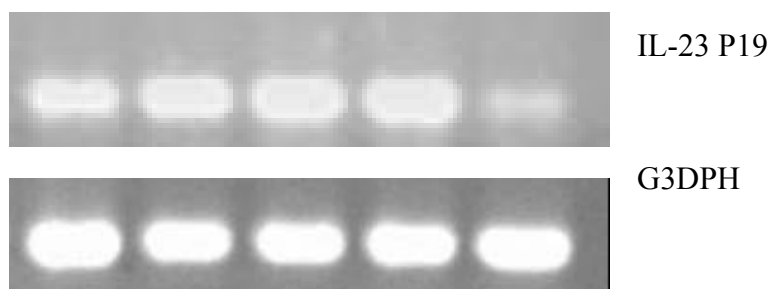
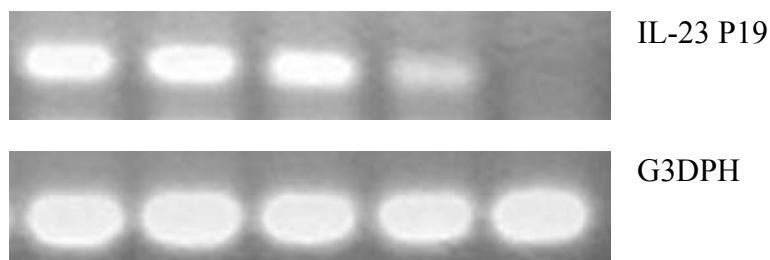


Fig.8 Time course of IL-1 α -stimulated IL-23 p19 gene expression in HFLS-RA cells. HFLS cells (1×10^6 in 100mm dish in serum free-modified Eagle's medium) were cultured with IL-1 α 1ng/mL for 3 hours, 6 hours, 18 hours, 24 hours and 48 hours, and IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR. Similar results were obtained in 4 experiments with cells from different RA patients.



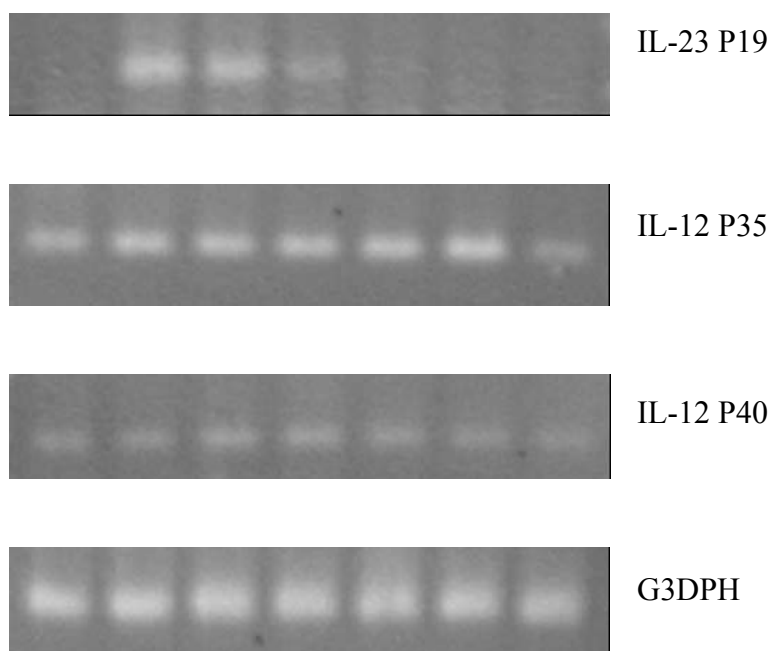
IL-1α (1 ng/mL)	+	+	+	+	+
PDTC(μM)	0	6.25	12.5	25	50

Fig.9 PDTC down-regulates IL-23 P19 mRNA expression in IL-1a-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 50μM) for 1 hour, then treated with IL-1a for 18 hours. IL-23 p19 gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR.



IL-1α (1 ng/mL)	+	+	+	+	+
Curcumin (μM)	0	6.25	12.5	25	50

Fig.10 Curcumin down-regulates IL-23 P19 mRNA expression in IL-1a-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 50μM) for 1 hour, then treated with IL-1a 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	0.625	1.25	2.5	5	5

Fig.11 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 2.5ng/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.

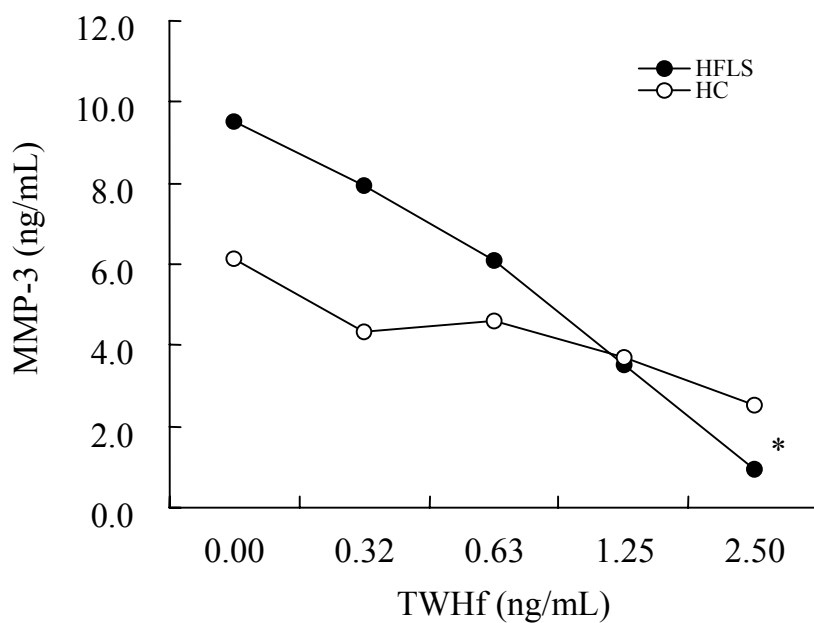


Fig.12 Quantification of MMP-3 release by human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. Primary HFLS-RA and HC (1×10^6 cells/well in 10 cm^2) were treated for 18 hours with IL-1 (1ng/mL) and with or without TWHf at the indicated concentrations. The levels of MMP-3 in the conditioned medium were determined by ELISA. *P < 0.05 versus control. (TWHf 0 ng/mL)

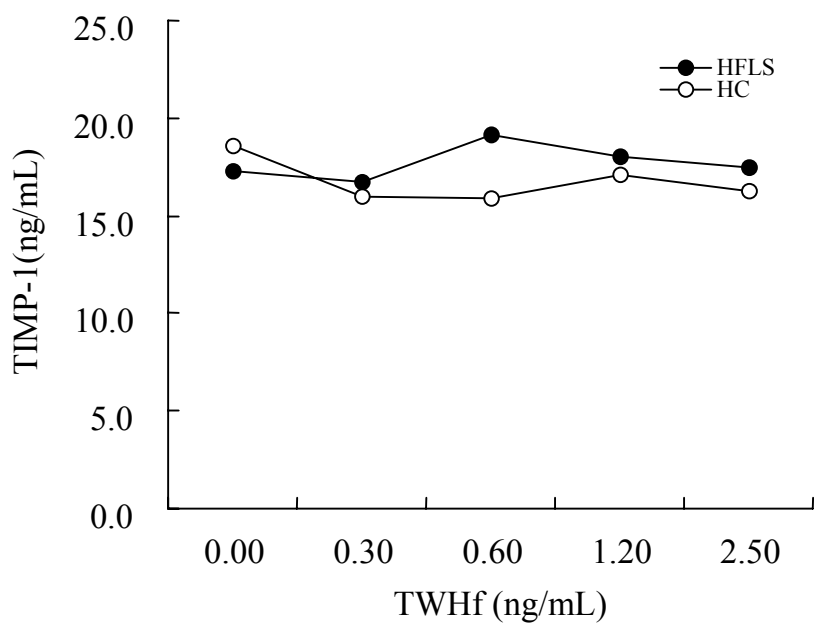


Fig.13 Quantification of TIMP-1 release by human fibroblast-like synoviocytes-RA and human chondrocyte. Primary HFLS-RA and HC (1×10^6 cells/well in 10cm^2) were treated for 18 hours with IL-1 (1ng/mL) and with or without TWHF at the indicated concentrations. The levels of TIMP-1 in the conditioned medium were determined by ELISA.

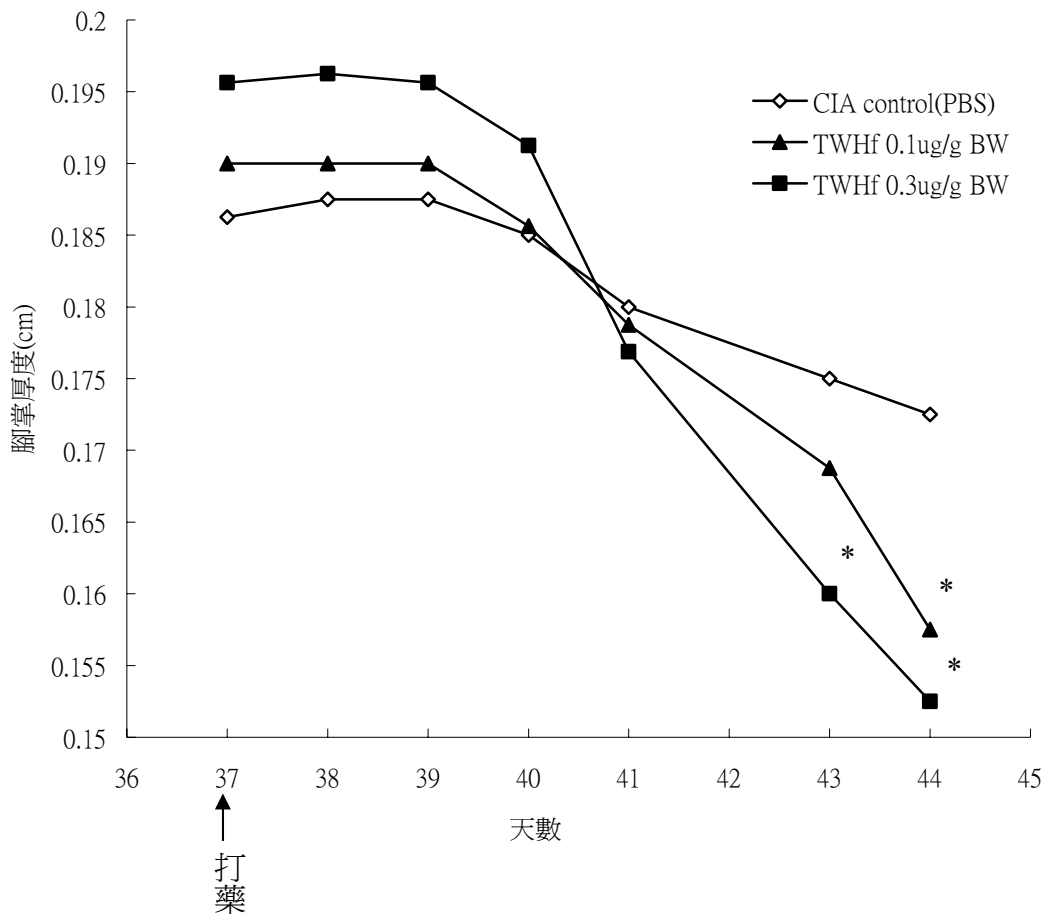


Fig.14 Therapeutic administration of TWHf reduces the severity of CIA. DBA/1 mice immunized on day 0 and boosted on day 21 with type II collagen were administered vehicle (PBS/enthol) or TWHf at 0.1 or 0.3 mg/kg, i.p, from 38 days. Histograms demonstrate the mean densitometric intensity (\pm SD) as assessed in four separate experiments. * $P < 0.05$ versus CIA control.

