

抗風濕中藥對細胞激素刺激類風濕滑膜 細胞凋亡（Apoptosis）之影響

The effect of anti-rheumatic herbs on cytokine- induced apoptosis of rheumatoid synovium

周昌德

中國醫藥學院附設醫院風濕免疫科

摘要

類風濕關節炎（RA）是一自體免疫病，近年來研究已瞭解許多不同組織細胞包括滑膜、關節液中之類纖維細胞及中性白血球易出現細胞凋亡之現象（Apoptosis）而細胞凋亡可能是自體免疫病發病之重要機轉，而Fas抗原在細胞表現增加或DNA斷裂增加可反映出細胞是否凋亡。而中藥治療RA種類相當繁多。本研究使用先前已證實具有抗風濕免疫作用中藥，包括雷公藤、薏以仁湯、麻杏薏甘湯與西藥Dexamethason及在體外與從RA分離之類纖維細胞（在細胞激素刺激下），以Flowcytometry去測定Fas抗原表現。另以Tunnel法去瞭解細胞核DNA，另外比較RA滑膜細胞及OA（退化性關節炎）Fas表現之差異性。結果顯示雷公藤及Dexamethason可明顯增加細胞之凋亡，而其中中藥包括薏以仁湯、葛根湯、桂枝芍藥知母湯、芍藥甘草湯、麻杏薏甘湯等卻無明顯作用。臨床上自體免疫病如RA等，使用雷公藤及類固醇有明顯之療效、其可能之機轉為經由增加不正常、發炎或免疫細胞之細胞凋亡所導致。

關鍵詞：中藥、滑膜細胞、風濕免疫病、Fas抗原

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis(RA) is an autoimmune disease. Recent studies have been demonstrated that Fas antigen and apoptosis were significantly increased in synovial fluid cells and synovial fibroblasts. The apoptosis of many activated inflammatory or immune cells is an important mechanism to protect patient from autoimmune and rheumatic disease. Many traditional herbs have been used to treat RA or other inflammatory joint disease. In this study, herb formulas including T2 (ethanol extraction of roots of TWF), Yi-Yin-Zen-Tang(YYZT), Ma-Sin-Yi-Gan-Tan(MSYGT), Ger-Gen Tang(GGT), Gue-Zi-Tsou-Zi-Mu-Tang(GTZMT) were extracted with ethanol and dried and dissolved in DMSO solution. Dexamethasone was used as control. Cytokines including TNF (and TGF (were used as stimulants. Different concentrations of herb formulas were incubated with RA synovial fibroblasts and cytokines for 2 days. Fas antigen before herb and after herb treatment was measured with Flowcytometry. The results showed TNF (can significantly increase synovial fibroblast Fas antigen expression. In contrast, TGF (decrease the Fas expression. All herb including T2, YYZT, GTZMT, after 2 days culture with synovial fibroblasts, can downregulate the Fas antigen expression on fibroblasts. In contrast, dexmethacin can upregulate the Fas antigen expression. The beneficial effect of dexamethacin to treat RA probably mediated through the mechanism of apoptosis (when Fas overexpressed) of those activated cells. However, all the traditional herb formulas did not accelerate the apoptosis of those activated synovial fibroblast.

Keywords: herb, synovial fibroblasts, Rheumatic-immune disease, Fas antigen

壹、前言

先前之研究已瞭解諸多傳統中藥可治療風濕免疫病，而其中可能之有效機轉包括類似非類固醇抗發炎製劑（NSAID），可抑制前列腺素，如雷公藤、麻杏薏甘湯、桂枝芍藥知母湯、薏以仁湯等，另外上述藥物亦可抑制T細胞分泌IL2 (1-8)。除雷公藤僅需低劑量（0.2-2.0 ug/ml）即可抑制外，其它皆需高劑量（250-500 ug/ml）方可抑制，故雷公藤較其他抗風濕免疫中藥具有較強之抗發炎及免疫抑制作用，而中藥紫河車則可增加狼瘡病患者T細胞分泌IL2。

近來，已知自體免疫病，尤其是紅斑性狼瘡周邊血之淋巴球與類風濕關節炎關節液中中性白血球有加速凋亡（Apoptosis）之情形(9-12)。類風濕關節炎在早期或活性期時，在病理組織內可發現滑膜上皮細胞大量增生、血管擴張及新生、發炎細胞浸潤。而上述組織細胞包括Fibroblast與Macrophage釋放細胞激素（IL1, TNF等）與前列腺素或膠原蛋白等皆明顯增強。然Dr. Firestein (13,14) 發現RA滑膜組織之Macrophage與fibroblast皆有凋亡（Apoptosis）之表現，其可能原因為RA組織內大量產生之cytokine與oxidant所形成，而cytokines包括Actinomycin D、Anti-fas抗體、IL1及TNF α 等皆可誘導Fas抗原表現(15-17)，另外使用in situ end labling (ISLE)法藉由斷裂DNA之多寡可瞭解細胞凋亡之狀況。細胞凋亡在許多免疫功能上扮演相當重要角色，包括胸腺內細胞之選擇及對病者免疫反應之抑制作用等。事實上，Apoptosis有缺陷時亦與自體免疫病有關。

本研究為了瞭解傳統中藥方劑其對類風濕關節炎滑膜組織纖維細胞（Fibroblast）之細胞凋亡是否有作用，擬選擇以具備有抗發炎免疫作用之中藥，包括雷公藤、麻杏薏甘湯、桂枝芍藥知母湯、薏以仁湯、芍藥甘草湯、葛根湯等及西藥Dexamethosone進行研究。此結果可提供未來以中藥治風濕免疫病，尤其是自體免疫病，有效性是否經由其增加或抑制滑膜纖維細胞之Apoptosis所導致。

貳、藥材與方法

- 一、中藥製備：雷公藤之根部經由ethanol抽取後所得之抽取物 (T2) 與包括薏以仁湯、麻杏薏甘湯、葛根湯、桂枝芍藥知母湯、芍藥甘草湯等 (從勝昌公司取得)，以水抽取後乾燥產物，進行下列研究。
- 二、西藥來源：本研究尚從Sigma公司取得之Dexamethasone (作為與中藥對照) 進行相同之研究。
- 三、病例來源：本研究之類風濕關節炎病例 (以1987年美國風濕病學會所訂之標準)，將從風濕科門診或入院病患取得。
- 四、滑膜組織類纖維細胞 (Fibroblast) 之來源與培養：從RA及OA (退化性關節炎) 病患接受關節置換術及滑膜切除術中取得多量之滑膜組織，以剪刀將其切成1毫米碎片，再以0.1% collagenase (或trypsin)處理於37°C CO₂培養箱內3小時，經由尼龍網過濾雜質及纖維後，得到之滑膜細胞沖洗3次後，放入含有fetal calf serum之培養基內，經由24至48小時可逐漸在培養盤內有fibroblast-like細胞生長。
- 五、流體細胞計數器測定類風濕滑膜細胞fas抗原表現：將滑膜細胞 (1 × 10⁵ cells) 加入Appendorf中離心二次及用1% FCS-PBS沖洗二次後留下20-30 ul上清液再與murine Anti-Human Fas IgM抗體5 ul在4°C作用20-30分，沖洗三次後加入FITC-Goat anti murine IgM 5 ul抗體在4°C作用20分，再以PBS沖洗二次，最後放入0.5 ml PBS以B-D公司之Flowcytometry去測定fas抗原之濃度。
- 六、中藥對細胞激素(TNF α) 誘發滑膜細胞Fas抗原表現影響：上述各種不同中藥配成不同濃度 (0-500 ug/ml)，另外與不同濃度 (10-1000 units) 之TNF α 及滑膜細胞共用作用於37°C CO₂培養箱24、48、72與120小時，然後再重覆上述步驟在測定Fas抗原之表現。

Immunohistochemistry Method

□ 染色方法

A. 冷凍組織切片染色 (ABC - HRP - Brown)

1. 將組織切片由-20 °C 冰箱中取出。
2. 置於室溫待乾，或放於 50 °C 烘箱中烘乾。
3. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
4. 以 3% 的 H₂O₂ 浸泡組織 30 分鐘至 1 小時。
5. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
6. 加入適當濃度的一次抗體 (Primary Antibody)，其抗體稀釋於稀釋液 (Dako) 中。
7. 放置 4°C 冰箱中一夜 (Over night)。
8. 隔天取出切片，並以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
9. 加入含二次抗體 (Biotin-conjugated IgG) 的第四劑試液 (Signet Kit)，並放置室溫 20 - 30 分鐘。
10. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
11. 加入 ABC-HRP 混合液：第五劑試液 (Signet Kit - labelling reagent)，並放置室溫 20 - 30 分鐘。
12. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
13. 加入含 DAB 之呈色液呈色，呈色時間亦視不同組織而定。呈色液：
DAB ----- 0.05 g (視不同組織而定)
TP buffer ----- 100 ml
3% H₂O₂ ----- 8.3 ul
(TP buffer : 10 mM Tris (pH7.2-7.5) in 0.9 % NaCl Solution)
14. 以 DDW 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
15. 作 Counterstain，以 DDW 輕洗組織切片。
16. 脫水封片。
17. 觀察結果。

Apoptosis - TUNEL Method

□ 冷凍組織切片法

1. 將組織切片由-20℃冰箱中取出。
2. 置於室溫待乾，或放於50℃烘箱中烘乾。
3. 以PBS輕洗組織切片5分鐘三次，共15分鐘。
4. 加入適當濃度的Proteinase K，放於室溫中放置10分至20分鐘。
 - Proteinase K (0.01u) 配置：
Proteinase K (2mg/ml) : 0.5 ul
10 mM Tris buffer (ph = 8) : 100 ul
5. 以PBS輕洗組織切片5分鐘三次，共15分鐘。
6. 以3%的H₂O₂浸泡組織5分鐘。
7. 以PBS輕洗組織切片5分鐘三次，共15分鐘。
8. 加入已配置的1X TdT Equilibration buffer，並放置10-30分鐘。
 - TdT Equilibration buffer 配置:(CALBIOCHEM)
5x TdT Equilibration buffer : 20 ul
d H₂O ----- : 80 ul
 - TdT Labeling Reaction mixture 配置:(冰上)
TdT Labeling Reaction mixture : 57.0 ul
TdT Enzyme ----- : 3.0 ul
9. 去除TdT Equilibration buffer。
10. 加入已配置的TdT Labeling Reaction mixture，並放於37℃放置90分鐘。
11. 以PBS輕洗組織切片(37℃)。
12. 加入Stop Solution，並放於37℃放置5分鐘。
13. 以PBS輕洗組織切片5分鐘三次，共15分鐘。
14. 加入Blacking buffer，並於室溫下放置10分鐘。

15. 去除 Blacking buffer 。
16. 加入 Conjugate buffer，並於室溫下放置 30 分鐘。
 - Conjugate buffer 配置：
 - 50X Conjugate buffer : 2 ul
 - Blacking buffer ----- : 98 ul
17. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘。
18. 加入含 DAB 之呈色液呈色，呈色液含 DAB = X g (視不同組織而定)，PB buffer = 100 ml，30 % 的 H₂O₂ = 16 ul，其呈色時間亦視不同組織而定。
19. 以 DDW 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
20. 作 Counterstain 。
21. 以 DDW 輕洗組織切片。
22. 脫水乾燥。
23. 封片。
24. 觀察結果。

Immunohistochemistry Double Stain in Culture Symovial Fibroblast

□ 染色方法

A. ABC - HRP- Blue and ABC - HRP- Brown

1. 取得培養的纖維母細胞 (2-10 代) 。
2. 將 1×10^4 細胞養於 Coverslips 上, 放於 37°C 、 5 % CO_2 的培養箱中培養一天。
3. 加入刺激物($\text{TNF-}\alpha$ $10 \mu\text{l} / \text{ml}$) , 於 37°C 、 5 % CO_2 的培養箱中培養一天。
4. 去上清液。
5. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次, 共 15 分鐘。
6. 以 3 % 的 H_2O_2 浸泡組織 30 分鐘至 1 小時。
7. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次, 共 15 分鐘。
8. 加入適當濃度的第一種一次抗體 (Primary Antibody), 其抗體稀釋於稀釋液 (Dako) 中。
9. 放置 4°C 冰箱中一夜 (Over night) 。
10. 隔天取出切片, 並以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次, 共 15 分鐘。
11. 加入含二次抗體 (Biotin-conjugated IgG) 的第四劑試液 (Signet Kit), 並放置室溫 20 - 30 分鐘。
12. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次, 共 15 分鐘。
13. 加入 ABC-HRP 混合液: 第五劑試液 (Signet Kit - labelling reagent), 並放置室溫 20 - 30 分鐘。
14. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次, 共 15 分鐘。
15. 以 175 mM Sodium Acetate 輕洗組織切片 2 次。

16. 加入含 DAB 之呈色液呈色，呈色時間亦視不同組織而定。呈色液：
 - DAB -----0.02 g (視不同組織而定)
 - 175 mM Sodium Acetate ----- 100 ml
 - 3 % H₂O₂ ----- 8.3 ul
 - Nickel Sulfate (NiSO₄) ----- 2.5 g
17. 以 DDW 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
18. 以 3 % 的 H₂O₂ 浸泡組織 30 分鐘至 1 小時。
19. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
20. 加入適當濃度的第二種一次抗體 (Primary Antibody)，其抗體稀釋於稀釋液 (Dako) 中。
21. 放置 4°C 冰箱中一夜 (Over night)。
22. 隔天取出切片，並以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
23. 加入含二次抗體 (Biotin-conjugated IgG) 的第四劑試液 (Signet Kit)，並放置室溫 20 - 30 分鐘。
24. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
25. 加入 ABC-HRP 混合液：第五劑試液 (Signet Kit - labelling reagent)，並放置室溫 20 - 30 分鐘。
26. 以 PBS 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
27. 加入含 DAB 之呈色液呈色，呈色時間亦視不同組織而定。呈色液：
 - DAB ----- 0.05 g (視不同組織而定)
 - TP buffer ----- 100 ml
 - 3 % H₂O₂ ----- 8.3 ul
 - (TP buffer : 10 mM Tris (ph7.2-7.5) in 0.9 % NaCl Solution)
28. 以 DDW 輕洗組織切片 5 分鐘三次，共 15 分鐘。
29. 以 glycerol 封片。
30. 觀察結果。

Isolation Fibroblast From Symovial Tissue

□ 纖維母細胞之取得

1. 開刀或關節鏡手術取的組織。
2. 將組織剪成小碎片，加入 20 % FCS - RPMI 25 ml。
3. 加入 10 % Collagenase 100 μ l 及 30 u /ml Hyaluronidase 38 μ l。
4. 37°C 攪拌 1 小時。
5. 用 nylon - mesh 過濾。
6. 加入 10 ml 的 10 % FCS - RPMI。
7. 1600 rpm 離心 5 分鐘。
8. 重複 6 - 7 步驟 2 次。
9. 將細胞放於 6 well 的細胞培養皿中，放於 37°C、5 % CO₂ 的培養箱中培養一天。
10. 觀察是否有纖維母細胞附著，若有則繼續培養至長滿（為第一代培養之纖維母細胞）。

Isolation Fibroblast From Symovial Tissue

□ 纖維母細胞之繼代

1. 將取得的纖維母細胞放於細胞培養皿中。
2. 加入適量的 10 % FCS - RPMI 培養液。
3. 放於 37 °C 、 5 % CO₂ 的培養箱中培養至滿。
4. 細胞長滿後，去除培養液，以 1X PBS 浸洗。
5. 去除 PBS ，加入 1.5 ml 之 1X Trypsin ，放於 37 °C 、 5 % CO₂ 的培養箱中 3-5 分鐘。
6. 用顯微鏡觀察細胞是否已經分離培養皿，若已分離，則加入 10 % FCS - RPMI 培養液以停止 Trypsinization 反應。若無，再將培養皿放於 37 °C 、 5 % CO₂ 的培養箱中直至細胞分離培養皿。
7. 收集細胞及培養液，離心，去上清液。
8. 以 10 % FCS - RPMI 培養液洗細胞 2 次。
9. 加入適量的 10 % FCS - RPMI 培養液並分別將細胞放於新的培養皿中（可分 2 - 3 個新的培養皿養細胞）。
10. 最後將細胞放於 37 °C 、 5 % CO₂ 的培養箱中培養。（此為新一代的細胞）

參、結果

本研究類風濕節炎與退化性關節炎及外傷患者（當作對照組）之Fas抗原表現結果，顯示RA不論在滑膜內層、下層、血管周邊等部位，其Fas抗原皆明顯高於OA之滑膜組織內細胞（如表一）。而滑膜組織內其Fas抗原，又以滑膜下層（SL）較中央部位（Central）明顯地增多（如表二）。

有關使用Tunnel方法，去測定RA患者滑膜組織何種細胞容易出現細胞內DNA斷裂，其結果顯示纖維狀（fibroblast）細胞（滑膜層）最多出現DNA斷裂，少數滑膜內單核球細胞亦可出現。然在OA患者，卻未明顯發現細胞內出現DNA斷裂情形。

至於本研究之重點，探討常見抗風濕免疫中藥，其對從滑膜內分離之纖維狀細胞所表現之細胞凋亡現象影響如何？結果顯示雷公藤及對照組Decadron，於TNF α 刺激下，在體外培養可明顯增加上述細胞Fas抗原表現及細胞凋亡現象，而其它之中藥包括麻杏薏甘湯、桂枝芍藥知母湯、薏以仁湯、芍藥甘草湯、葛根湯等並無明顯增加或抑制纖維細胞之Fas抗原或細胞凋亡之現象。

肆、討論

類風濕關節炎是一常見之自體免疫病，其疾病發生之機轉為多樣性，細胞免疫異常，如Macrophage活化釋放多量之IL1, TNF α , 前列腺素，上述介質可影響T cell活化，之後再刺激B細胞產生類風濕因子（RF），RF可與IgG結合形成免疫複合體造成局部組織或血管發炎。另外大量之IL1及TNF α 可刺激滑膜內Fibroblast及軟骨細胞或滑膜上皮細胞，導致大量發炎之酵素或介質增加，引起組織發炎、破壞。上述組織之發炎細胞，如欲其減少，身體可借由Fas抗原產生與Fas-Ligand結合，使得細胞產生凋亡破壞，如此減少爾後之發炎。

然RA可能因身體有缺陷，身體內無法有效產生Fas或產生多量之Fas，但確有障礙無法使得上述發炎免疫細胞破壞，而因大量細胞增生，產生自體免疫病症狀。

目前已知Steroid可增加淋巴細胞之細胞凋亡，使得體內淋巴球數目減少，另外本研究亦使用大陸常用治療RA之雷公藤，發現雷公藤亦有類似steroid之作用，即可增加纖維狀細胞之凋亡，使得因此細胞活化而導致組織發炎破壞得以減少，然因其它多數中藥並無明顯改變Fas表現，故配合臨床治療效果來看，雖雷公藤副作用較多，然其可藉由Fas抗原之作用，達到治療RA之效果，當然雷公藤作用尚有其它，包括抑制IL2, PGE2及免疫球蛋白等。

伍、結論與建議

本研究顯示腫瘤壞死因子(TNF)可增加Fas抗原表現。但TNF本身相對地增加細胞有秩序的死亡。中藥除了雷公藤外，大部分並不改善Fas抗原，反而增加類風濕關節炎滑膜上皮細胞之存活度。此意謂中藥可檢少或抑制細胞激素誘發滑膜上皮細胞有秩序地死亡，而此與Fas抗原表現多少無關。未來擬進行大更大型研究，去探討中藥內何種成分可影響細胞有秩序死亡。

陸、文獻

- 1 Weissmann G. Pathogenesis of inflammation: Effects of the pharmacological manipulation of arachidonic acid metabolism on the cytological response to inflammatory stimuli. *Drugs* 33(Supl.1):28,1987.
2. Tao X., L.S.Davis and P. Lipsky. Effect of an extract of the Chinese remedy *Tripterygium Wilfordii* Hook F on human immune responsiveness. *Arthritis Rheum* 34: 1274,1991.
3. Kikutani T. Therapy of rheumatoid arthritis by traditional Chinese drugs. *Proc Symp Wakan-Yaku* 8:21,1974.
4. Chang, N.C. and Tao, X.L. Preliminary trial of *Tripterygium wilfordii* Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis (abstract), XVth

Interational Congress of Rheumatology. Paris, 1981;6:21-27.

5. Chou CT, Chang ML, Chang DM: The efficacy and possible mechanisms on the treatment of adjuvant-induced arthritis in rats with Chinese herb-Suching-Huo -Hsuei-Tang. *Am J Chin Med* 1993;11:159-70.
6. Chou CT, Kau SO: The anti-inflammatory and anti-hyperuricemic effects of Chinese herb formula Danggui-Nian-Tong-tang on acute arthritis. *Am J Chin Med* 1995;23:267-71.
7. Chou CT: The antiinflammatory effect of an extract ripterigume (T2) on adjuvant-induced paw edema in rats and inflammatory mediator release. *Phytotherapy Res* 1996(in press).
8. The inhibitory effect of common traditional anti-rheumatic herb formulas on prostaglandin and IL2 in vitro *J Ethnopharmacology* 1998 in press.
9. Emlen W, Niebur J, Kadera R: Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythmatosus. *J Immunol* 1994;152:3685-92.
10. Nozawa K, Kayagaki N, Tolano Y, et al : Soluble Fas (APO-1,CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997;40:1126-29.
11. Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, et al: Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995;99:245-50.
12. Mysler E, Bini P, Drappa J, et al: The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J clin Invest* 1994;33:1029-34.
13. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ: Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 1995;96:1631-38.
14. Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, et al: Apoptosis in rheumatoid

arthritis p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 1996;149:2143-51.

15. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997 88:355-65.
16. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG: Induction of apoptosis (programmed cell death) in tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Bio-chem Soc Trans* 1990;18:343-345.
17. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al: Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994;153:1778-88.

Table 1: Fas expression in different synovial layers : comparison among RA, OA and control patients.

Variable	RA (n = 8)	OA (n = 8)	Control (n = 2)	F value	Pairwise comparison
Synovium lining	4.38 ± 2.07	2.16 ± 1.75	0.01 ± 0.00	5.63*	RA>Control
Sub-synovium	41.91 ± 10.74	5.30 ± 3.11	3.95 ± 3.74	51.03***	RA>OA; RA>Control
Perivascular	11.79 ± 1.82	2.70 ± 1.23	1.20 ± 0.85	85.51***	RA>OA; RA>Control
Central	12.38 ± 8.29	2.38 ± 0.94	4.70 ± 5.09	6.02*	RA>OA
Total	17.62 ± 4.53	3.14 ± 0.93	2.46 ± 1.99	46.35***	RA>OA; RA>Control

* : p < 0.05 ; ** : p < 0.01 ; *** : p < 0.001

Table 2 : Synovial Fas expression in RA, OA and control patients : comparison among different synovial layers.

Variable	Synovium lining (LL)	Sub- synovium (SL)	Perivascular	Central	F value	Pairwise comparison
RA (n = 8)	4.38 ± 2.07	41.91 ± 10.74	11.79 ± 1.82	12.38 ± 8.29	46.05***	SL>LL; SL>P; SL>C
OA (n = 8)	2.16 ± 1.75	5.30 ± 3.11	2.70 ± 1.23	2.38 ± 0.94	4.49**	SL>C
Control (n = 2)	0.01 ± 0.00	3.95 ± 3.74	1.20 ± 0.85	4.70 ± 5.09		

● : p < 0.05 ; ** : p < 0.01 ; *** : p < 0.001

Table 3. The apoptotic effect of herb formulas during in vitro culture with synorial fibroflasts

Herb	Fas Ag expression on fibroflasts (\bar{P} TNF - α stimulation)
(1) No herb	65%
(2) 雷公藤	95% ^Δ
(3) 麻杏薤甘湯	67%
(4) 桂枝芍藥知母湯	61%
(5) 葛根湯	72%
(6) Dexamethasone	96% ^Δ

$\Delta P < 0.05$

