

Histone H1이 마우스에서 Collagen Induced Arthritis에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 소아과학교실

양재호 · 신경미 · 김동수

Effect of Histone H1 on Collagen Induced Arthritis in Mice

Jae Ho Yang, M.D., Kyung Mi Shin, M.D. and Dong Soo Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : Besides the functions of histones in the nucleus of the cells, there is growing evidence that histones have many other extra-cellular or extra-nuclear functions, such as stabilizing axonemal microtubule of sea urchin sperm flagella. This microtule assembly function of the histone is similar to that of taxol, which has an effect of controlling joint inflammation. In this study, a possible suppressive effect of histones on a mouse collagen-induced arthritis(CIA) model was investigated.

Methods : A DBA/1 mouse were injected intradermally with emulsified chicken type II collagen. Three weeks after immunization, histone H1 was injected intraperitoneally twice a week. Clinical incidences of arthritis and arthritis index were measured. Anti-collagen antibodies and stimulation index of the splenocytes of mice were measured. IL-10 and TNF- α in the supernatants of the cultured splenocytes were measured by ELISA. IL-10 and TNF- α in the supernatants of the cultured U937 cells stimulated with histone H1 were measured by ELISA. mRNA expression of IL-10 and TNF- α in the U937 cells stimulated with histone H1 were observed.

Results : Histone H1 appears to be an effective suppressor of CIA in mice. When delivered intravenously, this suppressive effect of histone H1 was most effective compared to intraperitoneal or intradermal injections. The anti-collagen antibody level of the histone H1 treated group was significantly lower than that of the control group. A remarkable increase in the level of IL-10 was observed from the cultured supernatant of the splenocytes treated with histone H1. Also, an increase of IL-10 level was observed from the cultured supernatant of the U937 cells treated with histone H1.

Conclusion : According to these results, histone H1 appears to have a suppressive effect on CIA. The mechanism of the suppressive effect of histone may be a stimulation of IL-10 production. (**Korean J Pediatr** 2004;47:779-788)

Key Words : Histones, Arthritis, Collagen induced, Interleukin-10, Tumor necrosis factor α , U937 cells

서 론

류마티스 관절염은 만성 염증성 질환의 일종으로 관절을 싸고 있는 활막 내로 단핵구가 침윤되면서 점차 염증이 진행되어 광범위한 관절의 침식 및 파괴가 일어나는 질환이다. 이 질환은 다른 자가 면역성 질환과 마찬가지로 주로 중년층의 여자들에게

많이 나타나며, 주된 증상으로는 관절의 부종, 동통, 운동장애 등을 호소하게 된다. 또한 병리 소견과 현재까지의 다양한 연구 결과를 종합해 볼 때 관절을 싸고 있는 활막에 면역학적인 공격 인자들로 인하여 염증이 초래되는 것으로 생각되고 있다¹⁾.

현재 류마티스 관절염의 치료제로는 기존에 사용되던 비스테로이드성 항염증제를 비롯한 많은 제품들이 사용되고 있는데, 최근에는 관절염 진행에 있어서 중요하다고 인식되는 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), interleukin-1(IL-1) 등의 사이토카인을 억제함으로써 관절염의 치료효과를 나타내는 약제들이 개발되어 임상에서 사용되고 있으며²⁾ 이외에도 다양한 약제의 개발이 시도되고 있다. 특히 최근 들어 식물에서

접수 : 2004년 2월 18일, 승인 : 2004년 5월 7일
책임저자 : 김동수, 연세대학교 의과대학 소아과학교실
Correspondence : Dong Soo Kim, M.D.
Tel : 02)361-5524 Fax : 02)393-9118
E-mail : dskim6634@yumc.yonsei.ac.kr

추출한 물질을 이용한 연구가 많이 진행되고 있는데, 즉 녹차 추출물 중에 함유된 polyphen fraction³⁾, 오가피에서 추출한 수용성 추출물 및 지용성 추출물을 정제한 diterpenoid⁴⁻⁶⁾, 애엽에서 추출한 flavonoid⁷⁾, 주목에서 추출한 taxol⁸⁾과 같은 성분들이 마우스에서의 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되어 있어서 새로운 관절염 치료제로서의 가능성이 대두되고 있다.

이 중에서 taxol은 현재 항암제로 사용되고 있으며 튜불린 중합반응(tubulin polymerization)을 유도하여 상당히 안정된 비기능성 미세관(microtubule) 형성을 유도하는 것으로 알려져 있는데 이러한 기능 이외에도 G2/M기를 억제하여 활막세포의 증식을 저해하는 작용이 있다. 이러한 작용은 활막세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도해서 일으키는 것이 밝혀졌으며 아울러 이 기능은 류마티스 관절염 환자에서 판누스(pannus)형성을 억제할 수 있기 때문에 taxol이 류마티스 관절염에 실제적으로 사용될 수 있음이 시사되었다^{8, 9)}.

Histon은 DNA를 chromatin내로 folding해 넣는 역할을 하는 것이 주된 기능으로 알려진 단백질이나, 최근 들어 이러한 chromatin에서의 기능 이외에 다양한 호르몬과 같은 기능들이 밝혀지기 시작하였다¹⁰⁾. 말하자면 histone H3와 histone H4는 배양된 rat의 지방세포에 인슐린과 같은 기능이 있음이 보고되었고¹¹⁾, 골수회복과 관계되는 14-amino acid osteogenic peptide는 histone H4의 C terminus와 구조가 같음이 밝혀져 있다¹²⁾. 또한 homeostatic thymic hormone의 두 가지 중요한 구성요소가 histone H2A와 histone H2B임이 발견되었다¹³⁾. 이 밖에도 histone 자체가 성장호르몬, prolactin, thyrotropin, gonadotropin과 같은 다양한 호르몬의 분비에 관여한다는 보고가 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 아울러 histone은 microtubule assembly 기능이 있음이 밝혀졌는데¹⁷⁾ 이와 같은 작용은 마치 taxol이 가지고 있는 기능과 유사한 작용이기 때문에 이론적으로 taxol처럼 류마티스 관절염의 치료에 적용될 수 있음을 시사하고 있다.

최근 저자들은 이러한 점에 착안하여 histone이 실제적으로 류마티스 관절염의 동물 모델인 collagen induced arthritis를 억제하고 치료하는 효과를 가지고 있는지 알아보기 위하여 연구를 시도하였고 그 효과를 이미 보고하였다¹⁸⁾. 이번 연구에서는 histone의 이러한 효과를 확인하여 보고, 그 효과에 대한 기전을 조사해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

DBA/1 mouse는 5주령의 암컷을 일본 Charles Liver에서 수입하여 2주간 분교 실험동물 사육실에서 적응하도록 한 후 7주령(20-25 g)부터 실험에 사용하였다.

2. CIA의 유발

분리 정량된 chicken type II collagen(Sigma, St. Louis,

MO, USA)을 0.01N 아세트산에 녹여 2 mg/mL의 농도가 되도록 한 후 4℃에서 18시간정도 저어준 다음 동량의 Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞어 emulsion으로 만들었다. 이를 100 μL씩 마우스 꼬리의 기시 부근에 피내주사하고 처음 주사한 지 3주 후 동일한 방법으로 추가로 주사하였다.

3. 실험군

실험동물은 크게 3개 군으로 나누었다. 1군은 collagen을 접종하여 관절염을 유발시키면서 histone H1(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)을 1주에 2회 복강내로 투여하며(1 mg/kg), 2군은 collagen을 투여하면서 동시에 dexamethasone (1 mg/kg)을 복강내로 주 2회 투여하며, 제 3군은 collagen을 투여하여 관절염을 유발시키면서 아무런 처치를 하지 않았다. 두 번째 실험은 histone H1의 투여 방법을 각각 피내, 정주, 복강내로 달리하여 관절염의 변화를 관찰하였다. 정주는 꼬리정맥에 주사하였다. 세 번째 실험은 histone H1A의 용량을 달리하면서 투여하였는데 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg를 복강내로 투여하면서 관절염의 변화를 관찰하여 보았다.

4. 관절염발생률 및 관절염 지수 평가

주 2회 육안으로 발의 발적과 부종 및 기형의 발생 유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 발생률을 조사하였다. 또한 collagen induced arthritis(CIA) score는 일반적인 육안검사에 의하여 결정하였다. 즉 발적이나 부종 등 관절염의 증거가 없을 때는 0점, 1점은 한 두 개의 발가락에 종창을 동반한 홍조를 띄거나, 최소한의 종창이 유발된 상태, 2점은 확실한 홍조를 띄거나 국부적 상지종창, 그리고 이러한 것이 여러 발가락에서 관찰되는 경우이며, 3점은 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되며 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 하였다. 각각의 발에서 나타나는 score는 네 발을 각각 평가한 후 합산하여 최대 12점이 되도록 하였고, 실험자의 bias를 줄이기 위하여 최소 3인의 입회 하에 의견의 일치를 얻어 점수화 하였다.

5. 면역반응 평가

1) 항 collagen 항체치

실험 10주째에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 측정 시까지 검체는 영하 70℃에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 항 collagen 항체를 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, 96 well polystyrene microplate(Nunc, Denmark)의 각 well에 0.1 M PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 chicken type II collagen(10 μg/mL)을 가하여 4℃에서 16시간 동안 방치한 후 PBS-0.05% Tween 20으로 well을 4회 세척하였다. 비특이적 결합의 방지를 위해 각 well에 PBS-0.5% ovalbumin을 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 마우스의 혈청은 PBS로 1:100 희석하여 각 well에 넣고

실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 그 후 각 well에 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, A, M을 넣어 2시간 동안 반응시킨 후 5-aminosalicylic acid를 넣은 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 검체의 항 collagen 항체치 측정은 2차례 시행하여 평균값을 얻었다. 예비실험에서 심한 관절염 증세를 보인 DBA/1 마우스 5마리의 혼합혈청의 값을 100 unit로 정하고 흡광도와 unit 간에는 직선형의 상관관계를 확인하였으며 이때 정상 마우스에서는 항 collagen 항체가 검출되는지 확인하였다.

2) 비장 단핵세포 자극 지수

세포 면역 반응의 평가를 위해 비장 단핵세포의 collagen 항원에 대한 자극 지수를 측정하였다. 방법을 요약하면, 실험 10주째 동물을 희생한 후 비장을 무균적으로 적출하여 주변의 조직을 제거한 후 PBS로 수 차례 세척하였다. 비장 조직을 잘게 잘라 Hank's balanced salt solution(HBSS, containing 10 nM HEPES, pH 7.4)에 넣어 세포를 부드럽게 분리시킨 후 무균 거즈에 걸러 응괴를 제거하였다. 걸러진 세포 부유액은 원심분리하여 상층액을 제거한 후 0.015 M Tris/0.14 M NH₄Cl(pH 7.4)으로 처리하여 적혈구를 제거하고 다시 HBSS로 3회 세척하였다. 처리된 세포는 RPMI 1640-10% fetal calf serum media에 부유시켜 2×10⁶ cell/mL 농도로 만든 후 멸균된 well plate에 각 well당 100 μL씩 넣었다. 각 well에 collagen 용액(25 μg/mL) 100 μL를 넣은 후 5% CO₂ 배양기에서 37°C를 유지하며 96시간 동안 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 0.5 μCi (³H)-thymidine를 가한 후 cell harvester를 사용하여 glass fiber filter 위에 harvest하였다. 배양 후 베타측정기로 세포 내에 결합된 (³H)-thymidine를 측정하여 자극 지수(stimulation index, SI)를 다음과 같이 계산하였다.

$$SI = \frac{\text{mean CPM of } (^3\text{H}) \text{ TdR in collagen stimulated culture}}{\text{mean CPM of } (^3\text{H}) \text{ TdR in unstimulated culture}}$$

3) 비장세포 단핵구 및 혈청에서의 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 interleukin(IL)-10 치의 측정

위와 같은 방법으로 얻은 비장세포 단핵구를 배양하면서 10 μg/mL의 Concanavalin A로 자극하면서 자극 전, 자극 후 24시간 및 72시간에 상청액을 분리하여 싸이토카인의 측정 시까지 검체를 영하 70°C에서 보관하며 실험 직전에 해동하여 상청액내 TNF- α 및 IL-10 치를 mouse TNF- α 또는 IL-10 ELISA kit(R&D Systems, Inc.(Minneapolis, MN, USA))로 manufacturer manual의 방법에 따라 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, mouse TNF- α 또는 IL-10 항체가 도포된 96 well polystyrene microplate의 각 well에 표준농도의 mouse TNF- α 또는 IL-10을 넣고 동시에 마우스혈청을 넣었다. 이 plate를 2시간 동안 실온에 방치한 후 PBS-0.05% Tween 20으로 well을 4회 세척하였다. 여기에 다시 HRP-conjugated anti mouse TNF- α 또는 IL-10을 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 여

기에 다시 substrate chromogen solution을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1 M H₂SO₄를 넣어 반응을 중지시킨 후 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 여기서 얻은 흡광도를 가지고 TNF- α 또는 IL-10 표준 농도 곡선에 대입하여 혈청내의 TNF- α 및 IL-10 농도를 측정하였다.

혈청에서의 같은 cytokine의 측정은 마우스의 희생 시에 얻은 혈청을 영하 70°C에 보관하였다가 위와 같은 방법으로 측정하였다.

6. 조직염색

마우스를 희생시킬 때 각 군의 장기를 얻어 formalin으로 고정시킨 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

7. U937 cell line을 이용한 실험

Human monocytic cell line U937을 이용하여 세 군으로 나누어 실험하였다. 첫 번째 군은 아무런 자극이 없는 경우, 두 번째 군은 IFN- γ (R & D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 세포를 자극한 군, 세 번째는 IFN- γ 로 자극하면서 histone H1으로 처리한 군으로 나누었다.

U937세포를 24 well plate에 배양하였는데 세포수는 2×10⁵/mL로 하였으며 배지는 RPMI-1640에 10 mM HEPES, 100 μg/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin, 10%(v/v) fetal calf serum을 섞어서 배양하였다. INF- γ 는 100 U/mL이 되게 하여 세포를 자극하였고 histon H1A는 각각 0.1 μg/mL, 1 μg/mL, 10 μg/mL, 100 μg/mL로 자극하였다. 세포는 5% CO₂ 배양기에 37°C에 4일간 배양하였다.

1) 배양세포의 상청액에서 TNF- α 및 IL-10의 측정

위와 같은 방법으로 배양한 후 상청액을 떠서 ELISA kit를 이용하여 TNF- α 및 IL-10 치를 측정하였다. 측정방법은 앞에서 기술한대로 하였다.

2) 배양세포에서 TNF- α 및 IL-10 mRNA expression

(1) 총 RNA 분리

위와 같은 방법으로 상청액을 취하고 남은 세포를 가지고 RNeasy minikit(Quiagen Co., Hilden, Germany)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA 농도는 260 nm의 파장에서 UV-1601PC분광광도계를 이용하여 측정하였다.

(2) First strand cDNA 합성

분리한 총 RNA 2 μg으로부터 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(AMV)(Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN, USA)과 GeneAmp PCR system 9600(Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. First strand cDNA의 생성 여부를 알기 위해 생성된 반응 산물 10 μL, Taq polymerase(Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 0.5 U와 human beta actin primers(sense primer: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; antisenseprimer: 5'-CT-

CCTTAATGT CACGCACGATTTC-3')를 20 pmole씩 혼합하여 PCR을 시행하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600을 이용하여 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30 초를 23회 시행하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물 10 μL를 1.5% agarose gel에서 전기 영동한 후 밴드의 유무를 확인하였다.

(3) TNF-α 및 IL-10 primer를 이용한 PCR

TNF-α 및 IL-10 primer로서 각각 human TNF-α primer set for RT-PCR(Stratagene, LaJolla, LA, USA)과 human IL-10 primer set을 이용하여, 94°C에서 5분, 60°C에서 5분간 반응시킨 후, 72°C에서 1분 30초, 94°C에서 45초, 60°C에서 45초를 35회 시행하고 72°C에서 10분간 반응하였다. 양성 대조군으로 10⁵개의 herpes simplex virus를 HDMEC에 처리한 후 함께 시행하였다. PCR 산물 10 μL를 1.5% agarose gel에서 전기 영동한 후 밴드 유무를 관찰하였다. 이때 사용한 TNF-α의 primer set는 5'-AGCACAGAAAGCATGATCCCG-3'과 5'-CAGGCAATGACTCCCAAAGT-3'이었고, IL-10의 primer set는 5'-AACCAAGACCCAGACATCAAGGCG-3'과 5'-CAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG-3'이었다.

8. 통계

시기에 따른 각 군의 관절염 발생률은 Fisher's exact test 방법으로, 관절염 지수는 chi square test 방법으로 비교하였다. 항 collagen 항체 및 비장 단핵세포의 자극 지수, 그리고 TNF-α와 IL-10 치는 chi square test 방법으로 비교 분석하였다. 모든 통계적 검정에서 유의기준은 P값이 0.05 이하일 때로 하였다.

결 과

1. 관절염의 발생률

관절염의 발생은 모든 실험 동물군에서 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 발현되기 시작하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 시간이 경과하면서 관절염이 증가하여 type II collagen을 투여한 후 7주째에는 모든 실험 동물에서 관절염이 발생하였는데, 실험 시작 후 4주에 30%, 5주에 60%, 7주에 들어서는 100%의 마우스에서 관절염의 발생이 관찰되었다.

Dexamethasone을 투여한 군에서는 역시 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 관절염이 발생하였으며 이러한 관절염의 발생은 5주째 30%에서 관찰되고 그 이후에는 더 이상의 관절염의 발생의 증가가 관찰되지 않았다(P<0.05).

Histone H1를 투여한 군에서도 다른 군에서와 마찬가지로 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 관절염의 발생이 관찰되기 시작하였으며 이러한 관절염의 발생은 5주와 6주째에 38%로 가장 많이 발생되었고 그 후 7주째부터는 10~20%로 오히려 감소하는 추세를 관찰할 수 있었다(P<0.05). 이처럼 histone H1를 투여한 군에서는 아무것도 처치하지 않은 군과 비교할 때 의

미있는 관절염의 발생을 억제하는 결과를 보였으며 이러한 효과는 dexamethasone을 투여한 효과와 맞먹는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2. 관절염의 중등도

관절염의 중등도는 관절염 지수로 측정하였는데 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서는 관절염의 중등도가 계속해서 증가하여 type II collagen을 투여한 후 4주에는 2.0±0.3, 5주에 3.5±0.5, 6주에 5.0±0.8, 7주에 8.2±1.5, 9주에 8.6±1.7, 10주에 7.8±1.8을 보여서, 10주에 접어들면서 관절염의 중등도는 오히려 좋아지는 양상을 보여주었으나 통계적인 의미는 없었다. Histone H1를 투여한 군에서는 collagen 투여 후 4주에 1.2±0.4, 5주에 1.7±0.3, 6주에 2.2±0.3, 8주에 2.5±0.4, 10주에 1.8±0.3로 대조군에 비하여 의미있는 관절염의 중등도에 감소를 관찰할 수 있었다(P<0.01). Dexamethasone을 투여한 군에서는 histone H1를 투여한 군과 비슷한 관절염의 중등도를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

투여 방법에 따른 histone H1의 CIA 억제효과는 정맥으로 투여한 경우가 가장 효과가 좋았고 그 다음은 피하로 투여한 경우이며 그 다음은 복강내로 투여한 경우였으나, 피하와 복강내 투여방법은 통계적인 의미는 없었다(Fig. 3).

투여 용량에 따른 histone H1의 CIA 억제효과는 농도를 증량할 수록 억제효과가 높은 것처럼 관찰되었으나 기대했던 것과는 달리 농도가 높다고 억제효과가 높고 농도가 낮다고 억제효과가 낮은 것은 아니었다(Fig. 4).

3. 항 collagen 항체

항 collagen 항체치는 아무 처치도 하지 않은 군에서는 92.5±7.5 U, dexamethasone을 투여한 군에서는 61.4±24.3 U로 대조군에 비하여 의미있는 감소(P<0.05)를 보였으며, histone H1를 투여한 군에서는 54.0±17.0 U로 대조군에 비하여 역시 의미있

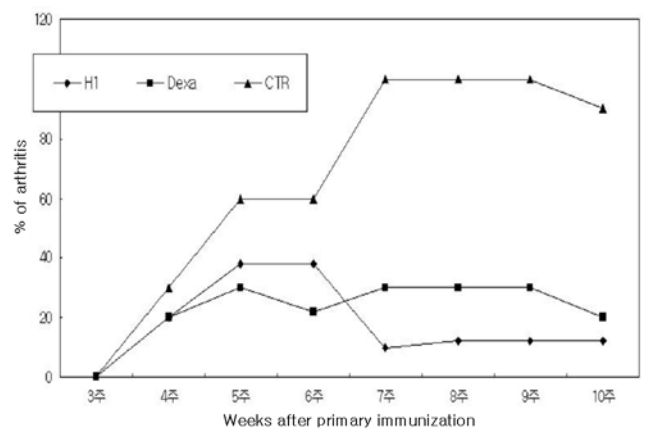


Fig. 1. Clinical incidence of collagen induced arthritis. Suppression of collagen induced arthritis by histone H1(H1) and dexamethasone(Dexa) was shown compared to control(CTR) (P<0.05). H1 : histone H1, Dexa : dexamethasone, CTR : control.

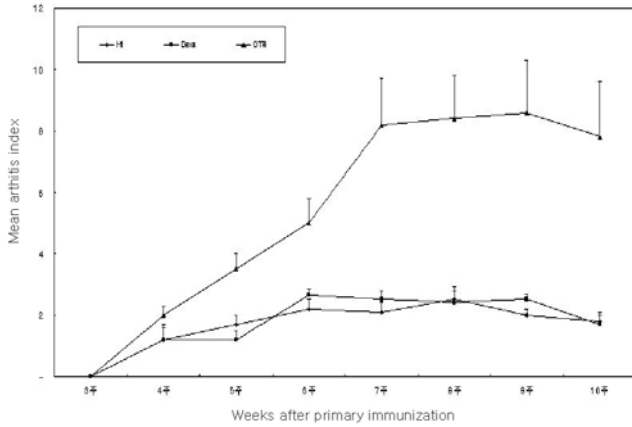


Fig. 2. Effect of histone H1 on collagen induced arthritis. The score of collagen induced arthritis differed significantly ($P < 0.05$) between the control(CTR) group mice and those given dexamethasone(Dexa) or histone H1(H1). H1 : histone H1, Dexa : dexamethasone, CTR : control.

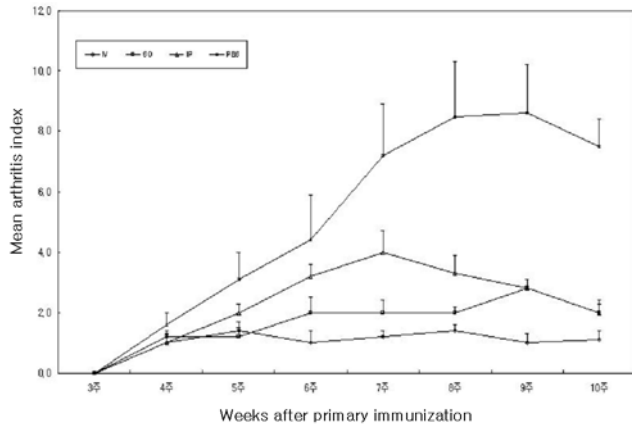


Fig. 3. Effect of delivery routes of histone H1 on collagen induced arthritis. Intravenous injection(IV) of histone H1 showed the most effective suppression of collagen induced arthritis compared to subcutaneous(SQ) injection and intraperitoneal(IP) injection. IV : intravenous injection, SQ : subcutaneous injection, IP : intraperitoneal injection.

는 감소($P < 0.01$) 보여 주었다(Table 1).

4. 비장 단핵세포 자극지수

비장 단핵세포의 collagen에 대한 자극지수는 대조군이 2.1 ± 0.9 , dexamethasone을 투여한 군에서 2.0 ± 0.9 , histone H1를 투여한 군에서 1.8 ± 1.1 로 세 군 공히 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(Table 2).

5. 배양된 비장세포 상청액 내의 TNF- α 및 IL-10치

각각의 실험군을 대상으로 마우스를 실험 시작 후 10주에 희생시켜서 얻은 비장세포 부유액을 배양하면서 Concanavalin A로 자극한 후에 얻은 배양 상청액내에서의 TNF- α 치는 각 군에서의 차이를 발견할 수 없었다(data not shown). 그러나

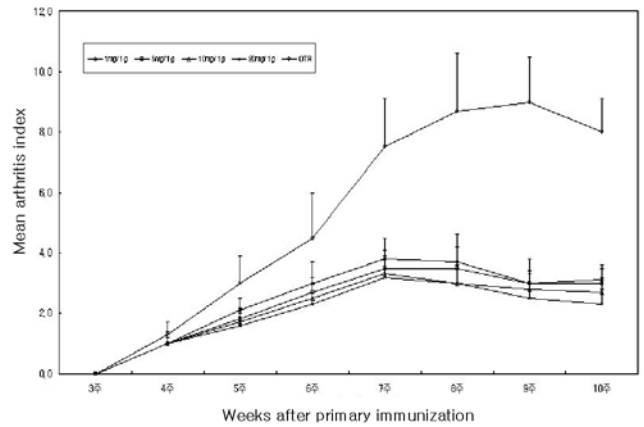


Fig. 4. Effect of doses of histone H1 on collagen induced arthritis. Dose dependent effect of histone H1 on the suppression of collagen induced arthritis was not observed. CTR : control.

Table 1. The Level of Anti-collagen Antibodies in each Experimental Groups

Groups	Anti-collagen antibody(arbitrary unit)
Controls	92.5 ± 7.5
Histone H1	$54.0 \pm 17.0^*$
Dexamethasone	$61.4 \pm 24.3^\dagger$

* $P < 0.01$ between controls group and histone H1 group

† $P < 0.05$ between controls group and dexamethasone group

Table 2. The Stimulation Indices of Splenic Mononuclear Cells to Chicken Type II Collagen in each Experimental Groups

Groups	Stimulation index(SI)
Controls	2.1 ± 0.9
Histone H1	1.8 ± 1.1
Dexamethasone	2.0 ± 0.9

IL-10은 자극 후 24시간까지는 별로 차이가 없다가 72시간 후에는 뚜렷하게 차이가 있어서 아무 처치도 하지 않은 군에서는 515 ± 15 pg/mL의 분비를 보인 반면, dexamethasone을 투여한 군에서는 $4,050 \pm 117$ pg/mL과 histone H1을 투여한 군에서는 $3,620 \pm 135$ pg/mL로 현저한 IL-10 분비의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 dexamethasone과 histone H1를 투여한 군에서는 비장단핵세포에서 IL-10의 생성을 현저하게 자극한다는 것을 알 수 있었다.

6. 혈청 TNF- α 및 IL-10치

각 군의 실험 동물에서 혈청내의 혈청 TNF- α 및 IL-10치를 조사한 결과 두 싸이토카인 모두 각 군에서 서로 다른 차이는 발견할 수 없었다(data not shown).

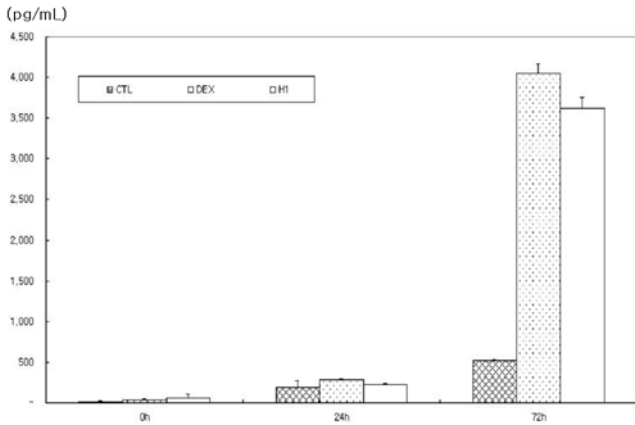


Fig. 5. Production of IL-10 from the splenocytes treated with histone H1(H1) and dexamethasone(DEX). Splenocytes of the mice treated with histone H1 and dexamethasone showed an increased production of IL-10 compared to control(CTL). CTL : control, DEX : dexamethasone, H1 : histone H1.

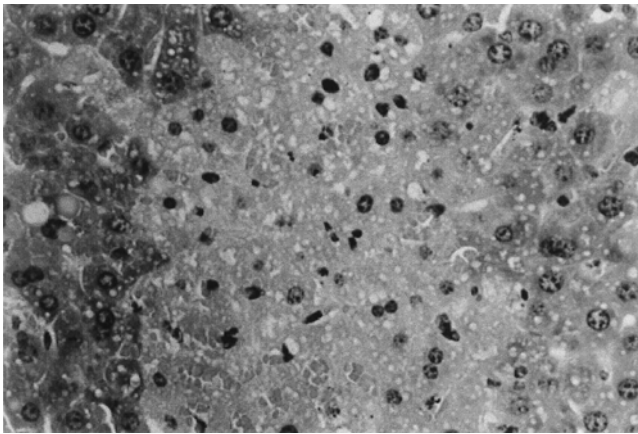


Fig. 6. Histologies of liver from a mouse treated with 20 mg/kg of histone H1. Lung, kidney and spleen showed normal histology(data not shown). Focal necrotic islands were observed in liver tissue($\times 400$).

7. 장기조직조건

Histone H1를 투여하면서 조사한 장기의 조직 조건은 특별한 변화는 관찰할 수 없었으나 20 mg/kg의 농도를 투여한 군에서 간 조직 내에 세포의 괴사가 몇 군데 발견되어, 이 농도의 histone H1는 간 손상을 초래할 수 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

8. 배양된 U937세포 상청액의 TNF- α 및 IL-10치

U937 cell line을 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 histone H1로 자극한 후 4일째 얻은 배양 상청액 내의 TNF- α 치의 분비는 차이가 없었으나(data not shown), IL-10치의 분비는 histone H1의 농도가 증가할수록 27.8 pg/mL, 30.7 pg/mL, 31.2 pg/mL, 35.7 pg/mL로 증가하는 양상을

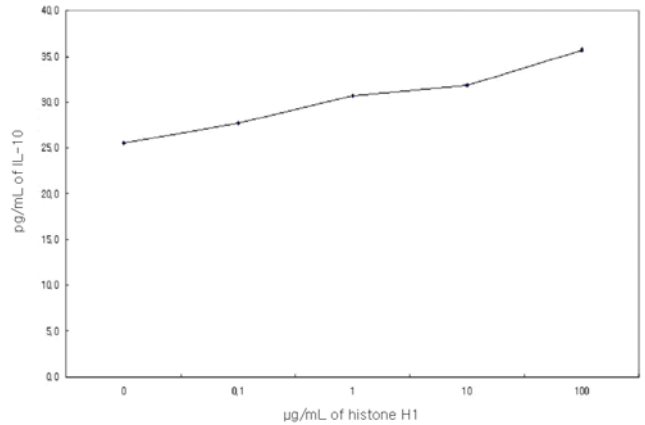


Fig. 7. Production of IL-10 from U937 cells cultured with different concentrations of histone H1. With increased concentrations of histone H1, IL-10 productions from U937 cells increased by dose dependent manner.

보였다(Fig. 7).

9. U937세포의 TNF- α 및 IL-10 mRNA 발현

U937 cell line을 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 histone H1로 자극한 후 4일째 얻은 세포 내의 TNF- α mRNA는 차이가 없었으나, IL-10 mRNA 표현은 histone H1의 농도가 증가할수록 비례하여 증가하는 양상을 보였다(Fig. 8).

고 찰

본 연구에 의하여 histone H1은 마우스에서 유발된 CIA의 치료 효과가 있음을 다시 확인 할 수 있었다. 이러한 치료효과 의 기전은 여러 가지로 생각할 수 있겠지만 아마도 histone H1이 생체 내에서 항 염증성 사이토카인인 IL-10의 생성을 자극하여 유발된 CIA에 대하여 치료 효과를 보인 것으로 생각할 수 있다.

근자에 들어서 식물에서 추출한 물질을 이용하여 류마티스 관절염을 치료해 보고자 하는 시도가 계속되고 있는데, 그 중에서 taxol은 이미 마우스에서 유도된 관절염의 치료에 효과가 좋은 것으로 보고가 되어 있다. Taxol은 주목이라는 식물에서 추출한 성분으로 유방암과 같은 암에서 항암제로 사용되고 있으며 그 작용기전은 튜브린 중합반응(tubulin polymerization)을 유도하여 상당히 안정된 비기능성 미세관(microtubule) 형성을 유도하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 taxol로 치료한 CIA의 경우에서, 관절 활막의 초기내층(initial lining)의 통합성(integrity)이 윤활막세포(synoviocyte)의 연장(elongation)과 분극(polarization)에 의하여 손상되고, 바닥판(basal lamina)이 없어지며, 사이질바탕질(interstitial matrix)이 증가되며, 혈관용적이 증가되는 양상의 현저한 호전을 보인다고 하였다¹⁹⁾.

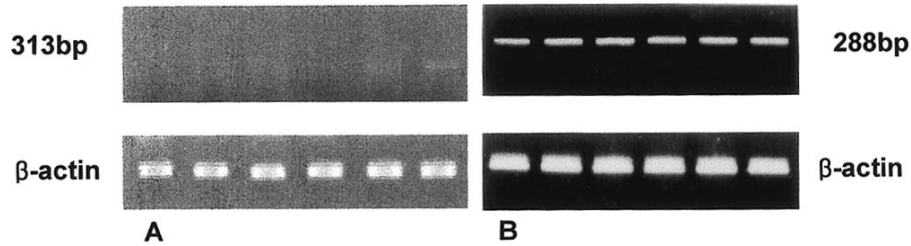


Fig. 8. (A) Effect of histone H1 treatment on mRNA expression for IL-10 in U937 cells. With increased concentrations of histone H1, expression of mRNA for IL-10 also increased. (B) Effect of histone H1 treatment on mRNA expression for TNF- α does not increase according to the stimulation of histone H1 concentration. With increased concentrations of histone H1, expression of TNF- α did not increase.

최근까지 histones의 기능은 주로 DNA의 안정화와 염색질(chromatin)의 압축(condensation)과 관계되어 있는 것, 말하자면 DNA를 염색질내로 folding해 넣는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다¹⁰. 그러나 histone의 핵산 내에서의 이러한 기능 이외에도 핵산 이외의 장소와 세포 외에서의 역할들이 밝혀지기 시작하면서 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 기능들에는 첫째로, histone 자체가 하나의 자가 항원으로 인식되어 자가 면역질환에서 histone에 대한 항체가 증가한다는 것이 보고되어 있는데 예를 들어 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스와 같은 질환에서 항체가 증가한다고 보고되어 있다²⁰⁻²³. 두 번째로, histone H2A와 histone H2B는 rat에서 homeostatic thymus hormone(HTH)의 성분으로 알려져 있고 그 기능으로는 corticosterone과 같은 호르몬의 생산을 자극하는 것으로 알려져 있다^{16, 24}. 또 histone H3와 histone H4는 배양된 rat의 지방세포에 인슐린과 같은 기능이 있음이 밝혀져 있고¹¹, 골수회복과 관계되는 14-amino acid osteogenic peptide는 histone H4의 C terminus와 구조가 같음이 밝혀져 있다¹². 그 외에도 homeostatic thymus hormone의 두 가지 중요한 구성요소가 histone H2A와 histone H2B임이 발견되었다¹³. 또한 histone은 성장호르몬, prolactin, thyrotropin, gonadotropin과 같은 다양한 호르몬의 분비에 관여한다는 보고가 있다¹⁴⁻¹⁶. 세 번째로는 histone H1은 in vitro와 동물 모델에서 백혈병 세포의 성장을 억제할 뿐만 아니라 세포 사멸에도 관계가 있다고 알려져 있다²⁵. 그리고 histone H1은 sea urchin egg내에 cytoskeleton의 integral component에서 발견되며 그 기능은 sea urchin sperm flagella의 axonemal microtubule의 안정화에 관계되는 것으로 알려져 있다¹⁷.

이와 같이 histone은 microtubule assembly 기능이 있음이 밝혀졌는데, 이 작용은 마치 taxol이 가지고 있는 기능과 유사한 작용이기 때문에 이론적으로 taxol처럼 류마티스 관절염의 치료에 적용될 수 있음을 시사하고 있다. 이번 연구는 이러한 histone의 기능을 이용한다면 실제로 류마티스 관절염의 치료제 개발할 수 있을 가능성을 알아보고, 류마티스 관절염에서 histone이 치료 효과가 있으면 그 효과가 관절내의 염증에 미치는

병리 기전 중에서 어떠한 부분에 그 영향을 갖는 지를 알아보았다.

이전의 보고¹⁸)에서처럼 마우스에서 유도한 CIA는 효과적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 더욱이 그 치료효과는 dexamethasone의 효과에 필적한 것으로, histone은 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 histone의 용량과 항염 효과의 상관관계에 대해서는 더욱 연구가 필요한데, 즉 Fig. 4에서 볼 수 있듯 histone의 용량이 증가할수록 염증에 더 좋은 효과를 보이는 것으로 생각되나 통계적으로 큰 의미가 없었고 오히려 20 mg/kg의 histone을 투여했을 때는 간독성 양상이 나타났기 때문이다. 흥미롭게도 치료효과는 정맥으로 투여할 때 가장 효과가 좋은 것으로 나타났는데, 이러한 효과는 아마도 혈행으로 투여된 약물이 직접적으로 염증이 있는 부위에 전달되기 때문이 아닌가 생각된다.

앞서도 기술한 것처럼 histone은 homeostatic thymic hormone의 기능을 가지고 있기 때문에 histone의 투여가 실제로 corticosterone의 분비에 영향을 미쳐서 이차적으로 CIA의 염증을 가라 앉힌 효과를 보일 수 있음을 추측할 수 있다. 이것을 증명하기 위해서는 마우스 혈중에서 corticosterone이 증가되는 지를 관찰하여야 하고 또 histone을 투여하면서 corticosterone의 증가에 대한 dynamic을 조사하여야 할 것으로 생각되며 이 부분에 관하여는 연구가 더 진행되어야 하겠다.

그러나 본 연구에서는 histone이 부신피질에 미치는 영향을 조사해 보기보다는, 류마티스 관절염이 생긴 관절 내에서 관계되는 염증성 사이토카인과는 어떠한 연관이 있는지를 알아보기 위하여 마우스의 혈중에서, 그리고 배양된 비장세포에서 나아가서 염증의 가장 중요한 중심 역할을 하는 가장 대표적인 TNF- α 와 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현에 대하여 조사하였다.

실제로 류마티스 관절염의 경우 TNF- α 수용체 길항제가 치료효과가 우수함이 입증되어 이미 구미 선진국에서는 치료제로 사용되고 있고 소아 연령층에서도 안전하게 사용될 수 있음이 입증되어 임상에서 사용하고 있다. 이것은 TNF- α 가 류마티스 관절염의 염증반응에 중추적인 역할을 한다는 것을 간접적으로 시사하는 것이라고 하겠다. 물론 모든 환자의 경우 이 약물이

효과가 있는 것은 아니다. 이 이야기는 TNF- α 이외에도 류마티스 관절염에 관계되는 염증반응은 복합적인 기전일 수 있음을 시사한다. 이러한 기전이 CIA에서도 동일하게 적용될 수 있다고 본다면 CIA에서도 염증 반응의 중심적인 역할을 하는 사이토카인은 TNF- α 일 수 있지만 다른 사이토카인도 복합적으로 작용할 수 있음을 추측할 수 있다. 이러한 이유에서인지는 몰라도 실제로 본 연구에서 마우스 혈중의 TNF- α 치는 각 군에 있어서 별로 차이가 없었고, 뿐만 아니라 비장세포에서의 TNF- α 생성도 별로 차이를 발견할 수 없었다. 이 결과를 통해서 histone의 항염효과는 TNF- α 생성의 억제보다는 다른 기전에 의한 것임을 추측할 수 있다.

IL-10은 마우스의 Th2세포에서 분비되는 사이토카인으로 Th1세포에서 분비되는 사이토카인의 분비를 억제하는 작용을 가지고 있어서 사이토카인 생성-저해 인자(cytokine synthesis-inhibitory factor)로 알려졌²⁶⁾. 이와 같은 IL-10이 류마티스 관절염이나 류마티스 관절염의 동물 모델인 CIA에서의 연관이 많이 보고되고 있는데, Llorente 등²⁷⁾의 보고에 의하면 임상적으로 IL-10은 자가면역성질환, 예를 들어 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루푸스 등에서 정상인과 비교할 때 혈중에 증가되어있는 양상이 관찰되며, 류마티스 관절염의 활막에서 IL-10은 다양으로 표현되어 있음이 보고되었고²⁸⁾, 류마티스 관절염 환자의 말초혈액에서 유도한 T 림프구와 비교할 때 활막에서 유도한 T 림프구에서 더 높은 IL-10의 표현을 볼 수가 있다고 하였다²⁹⁾. 또한 IL-10이 류마티스 관절염에서 항염효과를 가지는 중요한 사이토카인임은 이미 알려져 있는 사실이어서 이를 이용하여 마우스에서 CIA의 치료를 위하여 IL-10을 이용하려는 시도는 계속되어 왔다³⁰⁻³²⁾.

Walmsley 등³³⁾이나 Tanaka 등³⁴⁾의 실험에 의하면 실험동물에서 CIA를 유발한 후 IL-10을 투여함으로써 관절염의 발생률과 중증도를 감소시킨다는 결과를 보고하면서 IL-10을 이용한 치료 효과를 기대할 수 있음을 시사하였다. 뿐만 아니라 viral IL-10을 adenovirus-mediated transfer한 경우라든지, 사람의 IL-10 유전자를 전신적으로 마우스에 투여하여 실시한 실험에서도 관절염을 치료하는 효과가 있음이 보고되었고, IL-10 유전자를 관절 내로 직접 투여한 경우에도 CIA를 치료하는 효과는 뚜렷한 것으로 보고되었다³⁰⁻³²⁾. 이와 같은 효과는 B세포에 자극하여 항 type II collagen 항체의 IgG1/IgG2a 비율의 변화 때문이라고 주장한 반면³⁵⁾ 다른 연구자는 Type II collagen에 대한 T세포의 증식이 감소하기 때문이라고 보고하였다³⁶⁾. 항체를 가지고 IL-10을 중화할 경우 CIA의 정도가 심해지거나 또는 관절염의 발생 시기가 촉진되는 효과를 보이는 보고도 있다³⁷⁾. 실제로 IL-10-deficient B10.Q 마우스를 사용한 경우 CIA의 정도가 매우 심하다는 것을 보고하면서 IL-10이 CIA의 발생을 저하시키는 효과가 있다고 하였다³⁸⁾. 그러나 이와는 반대로 IL-10을 투여할 때 관절염의 증상이 악화된다는 보고도 있으며 실제로 혈중의 IL-10치는 마우스에서 CIA의 유발과는 무관하다는 보고도

있다³⁹⁾.

본 연구에 의하면 histone이 CIA를 억제하는 효과를 갖는 것은 TNF- α 의 생성과는 무관하나 실제로 IL-10의 생성을 촉진하기 때문에 생각되었다. 그 이유로는 histone을 처리한 마우스의 비장세포에서 IL-10의 생성이 의미있게 증가되었기 때문이며, 단핵구를 사용한 경우 histone으로 처리하였을 때 IL-10의 생성이 증가하고 실제로 세포내 IL-10 mRNA 발현이 증가하는 소견을 관찰할 수 있었다. 그러나 histone을 투여한 마우스의 혈중에 IL-10의 변화가 관찰되지 않은 것은 설명하기가 어렵지만, 아마도 관절염 내에 국소적으로 증가한 IL-10이 반드시 혈중에 반영될 수 없을 것이라는 점과 histone을 투여한 직후 마우스를 희생하지 않았고 투여 후 3일이 지난 다음에 희생시켜 얻은 혈청으로 검사를 하였기 때문으로 생각된다. 현재 결과로 가능한 설명은 histone에 의하여 자극된 염증세포가 마우스의 CIA조직으로 이행되어 그곳에서 국소적으로 IL-10의 생산이 증가되어 CIA의 억제 효과를 보인 것으로 설명할 수 있다. 물론 실제적으로 IL-10의 표현이 histone에 의하여 증가되어 CIA가 좋아졌다고 설명하기 위해서는 활막 세포를 배양하고 이 세포를 자극하며 histone을 투여한 결과를 연구하는 것이 더욱 확실한 결과를 보여줄 수 있고 기전을 설명하는데 좋은 자료가 될 수 있겠지만 이 부분은 좀더 연구가 되어야 할 부분으로 생각된다.

요 약

목적 : Histone의 세포핵 내에서의 역할이외에도 성체 정자 편모 축삭의 안정화와 같은 핵외, 세포 외에서의 역할에 대한 증거들이 밝혀지고 있다. 이러한 histone의 미세관 assembly 기능은 관절의 염증을 감소시키는 taxol의 기능과 유사점이 있다. 본 연구에서는 마우스의 collagen induced arthritis에서 histone의 효과를 알아보고자 하였다.

방법 : Chicken type II collagen을 DBA/1 마우스에 피내주사 하였다. 3주 경과 후 1주일에 2회 복강내로 histone H1을 주사하였다. Arthritis의 임상적 발생과 arthritis index를 측정하였고, anti-collagen antibody와 비장세포의 stimulation index를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 비장세포 배양 후 상층액에서 IL-10과 TNF- α 의 농도를 측정하였다. ELISA 방법을 통해 histone H1으로 처리한 U937 세포 배양 상층액에서 IL-10과 TNF- α 의 농도를 측정하였다. Histone H1으로 처리한 U937 세포의 IL-10과 TNF- α 에 대한 mRNA expression을 측정하였다.

결과 : Histone H1은 마우스에서의 CIA에 효과적인 억제제로 작용하는 것으로 사료된다. 이러한 histone H1의 효과는 정맥내로 주사할 경우 복강내, 피내 주사에 비해 더 효과가 큰 것으로 나타났다. Histone H1 처치를 받은 군의 anti-collagen antibody 농도는 대조군에 비해 의의있게 낮게 나타났다. Histone H1을 처리한 비장세포 배양 상층액에서는 IL-10 농도가

의의있게 증가하였다. 마찬가지로, histone H1으로 처리한 U937 세포배양 상층액에서도 IL-10 농도의 증가가 관찰되었다.

결론: Histone H1은 마우스에 유발된 CIA의 염증을 억제하는 효과를 갖는 것을 알 수 있었으며, 이러한 효과는 histone H1이 항염증성 사이토카인인 IL-10의 분비를 증가시키기 때문으로 생각된다.

References

- Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-89.
- ACR AD HOC Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:713-22.
- Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphen fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4524-9.
- Kim DS, Park YB, Lee BK, Han DR. The effect of diterpenoid extracted from *Acanthopanax Koreanum* on the collagen induced arthritis in DBA/1 Mice. *Journal of the Korean Rheumatism Association* 1999;6:300-9.
- Kim DS. The Effect of *Acanthopanax Koreanum* extract on the induction of collagen induced arthritis for DBA/1J mice. *Journal of the Korean Rheumatism Association* 1998;5:45-55.
- Kim DS, Song CH, Lee SK. The Effect of *Acanthopanax Koreanum* extract on the induction of collagen induced arthritis for DBA/1J Mice. *Korean J Pediatr* 1998;41:247-54.
- Yoon DY. Molecular approach to control inflammatory reaction. *Korean society of medical biochemistry and molecular biology news*. 2002;9:29-35.
- Brahn E, Tang C, Banquerigo ML. Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. *Arthritis Rheum* 1994;37:839-45.
- Hui A, Kulkarni GV, Hunter WL, McCulloch CA, Cruz TF. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1997;40:1073-84.
- Elgin SCR, Weintraub H. Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann Rev Biochem* 1975;44:725-74.
- McCroskey MC, Palazuk BJ, Pierce-Ramsey PA, Colca JR, Pearson JD. Insulin-like effects of histone H3 and H4 on isolated rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989;1011:212-9.
- Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhrad A, Shteyer A, Greenberg Z, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J* 1992;11:1867-73.
- Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Thyrotropin-releasing activity of histone H2A, H2B and peptide MB35. *Peptides* 1997;18:1315-9.
- Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Histones as extracellular messengers: effects on growth hormone secretion. *Cell Biol Int* 1997;21:787-92.
- Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Gonadotropin-releasing activity of histone H2A and H2B. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:288-94.
- Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Reichart R, Meites J. Homeostatic thymus hormone stimulates corticosterone secretion in a dose- and age-dependent manner in rats. *Neuroendocrinology* 1990;51:59-63.
- Multigner L, Gagnon J, Dorselaer AV, Job D. Stabilization of sea urchin flagellar micr tubule by histone H1. *Nature* 1992;360:33-9.
- Jung N, Kim DS, Kwon HY, Yi YW, Kim D, Kang AD, et al. Suppression of collagen-induced arthritis with histone H1. *Scand J Rheumatol* 2000;29:222-5.
- Arsenault AL, Lhotak S, Hunter WL, Banquerigo ML, Brahn E. Taxol involution of collagen-induced arthritis: ultrastructural correlation with the inhibition of synovitis and neovascularization. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:280-9.
- Miota S, Miura H, Misaki Y, Yamamoto K, Morino N, Sakurai H, et al. Relationship between autoepitope and DNA-binding site on a histone H1 molecule. *Autoimmunity* 1992;13:261-4.
- Leak AM, Woo P. Juvenile chronic arthritis, chronic iridocyclitis and reactivity to histones. *Ann Rheum Dis* 1991;50:653-7.
- Wesierska-Gadek J, Penner E, Lidner H, Hitchman E, Sauermann G. Autoantibodies against different histone H1 subtypes in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum* 1990;33:1273-8.
- Krippner H, Springer B, Merie S, Pirler K. Antibodies to histones of the IgG and IgM class in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1994;58:49-56.
- Reichart R, Zeppenzauer M, Jornvall H. Preparation of the homeostatic thymus hormone consist predominantly of histones 2a and 2b and suggest additional histone functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4871-5.
- Class R, Lindman S, Fassbender C, Leinenbach H, Rawer S, Emrich J, et al. Histone H1 suppresses tumor growth of leukemia cells in vitro, ex vivo and in an animal model suggesting extracellular functions of histones. *Am J Clin Oncol* 1995;3:522-30.
- Fiorentino D, Bond FMW, Mosman TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-90.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, et al. In vitro production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus: a potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994;37:1647-55.
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-27.
- Cohen SB, Katsikis PD, Chu CQ, Thomssen H, Webb LM, Maini RN, et al. High level of interleukin-10 production by the activated T cell population within the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 1995;38:946-52.
- Kim KN, Watanabe S, Ma Y, Thornton S, Giannini EH, Hirsch R. Viral IL-10 and soluble TNF receptor act syner-

- gistically to inhibit collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene transfer. *J Immunol* 2000;164:1576-81.
- 31) Quattrocchi E, Dallman MJ, Dhillon AP, Quaglia A, Baginato G, Feldmann M. Murine IL-10 gene transfer inhibits established collagen-induced arthritis and reduces adenovirus-mediated inflammatory responses in mouse liver. *J Immunol* 2001;166:5970-8.
- 32) Fellowes R, Etheridge CJ, Coade S, Cooper RG, Stewart L, Miller AD, et al. Amelioration of established collagen induced arthritis by syster IL-10 gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:967-77.
- 33) Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, Parry S, Williams RO, Maini RN, et al. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:495-503.
- 34) Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, Miyahara H, Nakashima H, Kuga S, et al. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 1996;45:283-8.
- 35) Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C, Auriault C, Sany J, Jorgensen C. Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1998;160:5213-20.
- 36) Ma Y, Thornton S, Duwel LE, Boivin GP, Giannini EH, Leiden JM, et al. Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene tranfer. *J Immunol* 1998;161:1516-24.
- 37) Joosten LA, Lubberts AE, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ, Goldman M, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997;40:249-60.
- 38) Johansson ÅCM, Hansson A, Nandakumar KS, Holmdahl R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J Immunol* 2001;167:3505-12.
- 39) Yoo B, Kim C, Choi SW, Kim MJ, Oh SW, Moon HB. Effect of interleukin-10 on development of murine collagen-induced arthritis. *J Korean Rheum Assoc* 1997;4:111-20.