

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果 報告

苦職在單納尿酸鹽結晶誘導之類急性痛風關節炎所扮 演的角色

計畫類別：■ 個別型計畫 □ 整合型計畫

計畫編號：NSC90 - 2626 - B - 041 - 002 -

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：

許明志：中國醫藥學院醫學系 hsumj@mail.cmc.edu.tw

共同主持人：

楊政哲：嘉南藥理科技大學藥學系

楊竹茂：嘉南藥理科技大學藥學系

計畫參與人員

張文正：中國醫藥學院醫學系

吳介信：中國醫藥學院醫學系

中 華 民 國 91 年 10 月 10 日

一、 中文摘要

關鍵詞：*Physalis angulata* , Air pouch, Acute Gouty Arthritis ,

Interleukin-1 β , TNF α

本計劃中，我們研究新鮮的苦蕒 *Physalis angulata* L.，在單鈉尿酸鹽結晶 Monosodium urate crystal：MSU 所誘發的類急性痛風的大鼠 Wistar rats 中所扮演的角色。苦蕒蒸餾水抽出物

Physalis angulata distill water extraction：PAWE，給予因單鈉尿酸鹽結晶所誘發之類急性痛風的大鼠。除了正常組之外，先以 Sterile-filtered 的純淨空氣 5ml 打入控制組、藥物對照組及各種藥物組的 Wistar 大鼠背部皮下組織。然後連續 3 天再以 3 ml 之空氣打入相同部位，最後產生類滑膜囊的 air pouch。7 天以後，以先前製備好之 MSU 10 mg/ in a volume of 1 ml sterile, pyrogen-free normal saline 打入 air pouch 中來誘發產生類似急性痛風關節炎的動物模式。於 MSU 注射一小時後，正常組及控制組口服給與生理食鹽水；藥物對照組則給與 Colchicine 5 mg/kg；其餘藥物組則以口服給與三種不同濃度之苦蕒蒸餾水抽出物，其劑量分別為 100, 300, 1000 mg/kg 於 MSU 結晶注射完之後的 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48 小時之後，由 air pouch 中抽出其組織液，然後分別測定 IL-1 β 及

TNF α 的濃度。IL-1 β 的濃度在 MSU 注射後的第 2 小時達到最高濃度。苦蕒的蒸餾水抽出物 200 及 1000 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，也可以有效的抑制 IL-1 β 的濃度 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 。TNF α 在 MSU 注射後的第 2 小時即達到最高濃度。苦蕒的蒸餾水抽出物 200，及 1000 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，有效的抑制 TNF α 的濃度 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 。而苦蕒的蒸餾水抽出物 100 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，無法有效的抑制 TNF α 的濃度以及 IL-1 β 的濃度。

二、 緣由與目的

苦蕒 *Physalis angulata* L. 係茄科 (Solanaceae) 植物，又名炮仔草。近年來，民間常用本植物來治療痛風，然而，有關本省市售苦蕒之藥理研究相當缺乏，本實驗為評估市售苦蕒在治療痛風方面的藥理活性，同時開發本土藥用植物新資源。

目前治療急性痛風的首選藥物是 NSAIDs。另一種對急性痛風的藥物選擇為秋水仙素 Colchicine。它在對抗疼痛達到令人滿意的程度。不過，它也有許多的副作用。因此，醫藥學界也急需在我國傳統的中醫藥材中找到一些對於急性痛風具有療效或是可以長期性安全服用，以

預防急性痛風所帶來的嚴重發炎疼痛現象。

目前生藥之藥品使用來歸類，有為數不少的生藥可能含有免疫加強劑的成分。所以常用來改變病人的免疫抑制，提昇病人對於腫瘤的免疫效能。有些研究明顯的展現整株之苦蕺熱水抽出物具有抑制癌細胞之成長甚或可能會殺死癌細胞 [Juang, unpublished data]。Juang¹ 同時也將全株苦蕺抽出物-Withangulatin A，用於癌症之治療，發現其有穩定 DNA-topoisomerase II 複合物之能力。因為，當加入了 SDS-proteinase K 時，會破壞 DNA-topoisomerase II 複合物¹。Withangulatin A 是苦蕺的一種主要成分，其可能作用在 topoisomerase II，進而引發 topoisomerase-調控之 DNA 破壞¹。Lee et al.² 在發現 Withangulatin A，在 9L 老鼠腦瘤中發現這一種有效成分會引發 heat-shock response 並且會改變蛋白質的磷酸化。所以在體內實驗中，發現其會具有 cytotoxic 之活性，並且可以抑制一般性蛋白的合成。Lin et al.³ 也陳述不同部分的苦蕺萃取物會對細胞增生有不同程度的影響，同時也發現 PA-VII 及 PA-VII-C 會刺激 B-細胞的活性，而對 T-細胞的活性較無影響。另外一個實驗顯示 *Physalis angulata* L. (Solanaceae) 的乙醇萃取物—PA-IV-2 在體外實驗中表現出其具有細胞毒性⁴ 另外有一種 *Benincasa cerifera* 之根部熱水萃取物可能激發 B 細胞本身的絲狀分裂發生，進而增強抗體之免疫功能並且，提昇其抗癌的活性⁵。

除上述諸多有關於改變免疫抑制的功能之外，盛產在熱帶及亞熱帶的 *Physalis angulata* 常被用在

Rheumatism 的止痛上面⁴。並且在苦蕺的抽出物當中發現某些成分，可以增加自然殺手細胞在健康的亦或有癌症之小鼠之活性⁶

急性之嗜中性白血球依賴性之發炎與急性痛風有很重要的關聯性⁷⁻⁹。尿酸結石包括有許多不同程度之嗜中性白血球的趨化性。還可能包括有其他某些之 Cytokines 如：Interleukin-8, Growth-related oncogene α [GRO α]。本實驗最主要的是要了解苦蕺蒸餾水抽出物，是否對於以尿酸結晶所誘發之類急性痛風與嗜中性球，IL-1 β 及 TNF α 之移動有所關聯。意即，苦蕺蒸餾水抽出物是否會改變嗜中性球的移動或是降低其它 Cytokines 之 air pouch 中之含量。單鈉尿酸鹽結晶注射進入小鼠皮下組織的 air pouches，通常大概在 4 小時左右，會引發正常隻小鼠的 pouch fluid leukocytes 主要是 neutrophil 產生 10 倍以上嗜中性白血球的增加。而這個 leukocyte 會與 pouch 之內側組織連結在一起。

Phelps and McCarty¹⁰ 更很清楚的建立起急性痛風發炎必須依賴嗜中性白血球，事實上上述兩者之間具有非常重要而密不可分之關連性。游離的尿酸結晶會刺激 Phagocytes 及 synovial lining cells 產生多種不同的 Allergic mediators⁸。上述 Allergic mediators 包括 Interleukin-1 β , Interleukin-8 以及 Tumor necrosis factor α ¹¹⁻¹²。一般而言，嗜中性白血球在關節滑膜液是很少見的，所以，急性痛風之所以會產生，可能就與上述之 Interleukin-1 β 以及 Tumor necrosis factor α [TNF α] 有相對的關連。因為，此二種 allergic mediators 在急性痛風發作期會促進 neutrophil 與 endothelial 之黏連⁸。

通常急性痛風性關節炎的產生需

要嗜中性白血球的所謂血球游出〔Transmigration〕。而這是因為一種小分子的嗜中性白血球驅化 polypeptides〔crystal-induced chemotactic factors: CCF〕⁸。CCF 的活性與 neutrophil chemotactic C-X-C chemokines〔包含 Interleukin-8〕¹³。Interleukin-8 可能與 90% 之嗜中性白血球驅化性有關。在細胞培養液當中，當 monocytes 遇到尿酸鹽結晶時，monocytes 在兩小時內會釋放出 Interleukin-8。Interleukin-8 之量在 24 小時內會持續的增加⁷。最後 Interleukin-8 會大量存在於滑囊液當中。此時 Interleukin-8 並不輕易被 proteolytic inactivation 掉，因此而延長其之半衰期¹⁴。關節內注射 Interleukin-8 也會引起嗜中性球調控的滑囊膜炎^{8, 14}。Interleukin-8 本身會引起 Synovitis 而不需要加入其它的 Allergic mediators，如：Interleukin-1 以及 Tumor necrosis factor α ，或是物理性的刺激物，如：尿酸鹽結晶物。因此，IL-8 不僅提供了嗜中性球之 Chemotactic gradient，同時，也促進嗜中性球和內皮細胞之黏連。Rapid release of IL-8 by crystal-activated resident mononuclear phagocytes and synovial lining cells 是引起急性痛風的其中一個機轉。秋水仙素是目前用來治療急性痛風的藥物之一，因為，秋水仙素可以抑制一些針對 IL-8 所產生之嗜中性球反應¹⁵。此實驗我們將以苦蕒蒸餾水抽出物用來治療因尿酸結晶〔Monosodium urate crystal〕所引發出來的急性痛風發炎症狀。

三、 實施方法及進行步驟：

1. 實驗材料之製備

取新鮮苦蕒 *Physalis angulata* L. 之全草，約 2 公斤，分別切成小絲狀，用三公升的蒸餾水，於水浴中煮沸一小時，然後過濾，如此重覆三次，合併三次濾液，將其減壓濃縮至適量，再行冷凍乾燥成粉末，於實驗前，用蒸餾水配製成各種不同濃度〔100 mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg〕，再進行各項藥理活性評估。

2. Monosodium urate monohydrate (MSU) crystal 之製備

根據 McCarty and Faires¹⁶ 之描述，尿酸〔0.01 M〕溶於含 0.01 M NaOH 的水中。攪拌約 4 小時之後，溶液放在室溫下一整個晚上，結果所產生的結晶以含 0.01 M NaOH 的水沖洗，蒸發乾，然後，在 200 中加熱約 2 小時，再放入 endotoxin-free 之 Saline 中。最後再以超音波處理以殺菌。這樣子的處理最後可以得到長度約 5-20 μ m 的結晶。所得到之產物為無 pyrogen 之尿酸結晶。

3. Monosodium urate monohydrate (MSU) crystal 誘發 Wistar Rat 產生類急性痛風的動物模式

A. 動物處理

採用購自成功大學動物中心的 Wistar 系雄性大鼠，所有的

動物均飼養在具有空調的房間，溫度維持在 22 ± 3 ，相對濕度為 $60 \pm 10\%$ ，並且於半日照的環境下，餵以福壽牌的老鼠飼料，任其自由飲水和進食，將實驗動物體重控制在 200–300 公克。在動物室適應大約一個禮拜後再進行實驗。

B. Air Pouch Model of Crystal-induced Synovitis & the effects of PAWE on the MSU induced Gouty arthritis

根據 Nickerson-Nutter 等人¹⁷所描述方法，將實驗動物分成六組，分別為正常組、控制組、藥物對照組及各種藥物組。先將 Sterile-filtered air 5ml 打入控制組、藥物對照組及各種藥物組的 Wistar 大鼠背部皮下組織，然後連續 3 天再以 3 ml 之空氣打入相同部位，最後會產生類似 Synovium-like 之 membrane 的 Air Pouch。7 天以後，以先前製備好之 Urate crystal (10 mg/ in a volume of 1 ml sterile, pyrogen-free normal saline) 打入 Air Pouch 中來誘發產生類似急性痛風的動物模式。於 Urate crystal 注射一小時後，正常組及控制組口服給與生理食鹽水；藥物對照組則給與 Colchicine (5 mg/kg)；其餘藥物組則以口服給與三種不同濃度之苦蘆水抽出物，其劑量分別為 100, 300, 1000 mg/kg。其簡要流程如下：

a. 正常組：僅給與生理食鹽水

b. 控制組：Wistar Rats (Air pouch) + post-injection of MSU 結晶一小時後口服給與生理食鹽水

c. 藥物對照組：Wistar Rats (Air pouch) + post-injection of MSU 結晶一小時後口服給與 Colchicine

d. Wistar Rats (Air pouch) + post-injection of MSU 結晶一小時後口服給與低劑量 **Dried PAWE (100 mg/kg)**

e. Wistar Rats (Air pouch) + post-injection of MSU 結晶一小時後口服給與中劑量 **Dried PAWE (300 mg/kg)**

f. Wistar Rats (Air pouch) + post-injection of MSU 結晶一小時後口服給與高劑量 **Dried PAWE (1000 mg/kg)**

於 Post-injection of MSU 結晶 2, 4, 6, 9, 12, 24 小時之後，由 Air pouch 中抽出其組織液，然後分別測定 IL-1 β 及 TNF α 的濃度。

4. Measurement of Cytokines
IL-1 β , and TNF α 分別以 ELISA 方法來加以測定之¹⁹。
實驗操作敘述如下：

A. Rat IL-1 β ELISA

加入 Biotinylated antibody，然後加入標準品及從 air pouch 取出未經稀釋的樣品，在 20 incubate 30 分鐘。再加入 Streptavidin solution，也是一樣在 20

incubate 30 分鐘。最後，stop the plate，然後以 ELISA Reader (read at 450 nm)來讀取。

B. Rat TNF α ELISA

加入標準品及由 air pouch 採出未稀釋的樣品，在 20 incubate 60 分鐘，wash 並且加入 Biotinylated antibody，在 20 incubate 120 分鐘。並加入 Streptavidin solution，也是一樣在 20 incubate 30 分鐘。Wash 並且加入 TMB substrate solution 並且 incubate 在 20 約 30 分鐘。最後，stop the plate，接著以 ELISA Reader 來讀取。

5. 分析方法：統計方法將以 ANOVA， $p < 0.05$ ，則認為是具有統計學上的意義。所有的 data 將以 Mean $\pm$ SD。

四、結果與討論

1. MSU 結晶注射以後所引起的白血球的浸潤 leukocyte infiltration 如圖一所示，MSU 注射後 9 小時可以發現 leukocyte infiltration 迅速上升，然後，在注射後 48 小時則回到原點。區別細胞分析，我們發現大部分這些浸潤的白血球有 90%都是嗜中性白血球。(data 沒有加入)
2. MSU 結晶注射以後所引起的 IL-1 β 及 TNF α 的

濃度改變，以及同時給予苦蕒蒸餾水抽出物之後，IL-1 β 及 TNF α 的濃度改變

本實驗最主要的目的就是想要了解苦蕒的蒸餾水抽出物是否可以在動物體內試驗中，有效抑制 MSU 結晶誘發產生的類急性痛風關節炎。我們觀察 MSU 結晶處理過的大鼠背部之 air pouch，發現其部分的 cytokines 有增加的傾向。而有給予苦蕒的實驗組，其部分的 cytokines 則並沒有上升的趨勢。由此我們可以了解，本實驗動物模式於本實驗的可行性¹⁷。我們以 ELISA 的方式，去測定 IL-1 β 及 TNF α ，結果顯示，在大鼠背部皮下組織 air pouch 之抽出物，可以測到 IL-1 β 的濃度在 MSU 注射後的第 2 小時即有明顯的上升，並且達到最高點 figure 2-4。TNF α 則是在 MSU 注射後的第 2 小時即有明顯的上升，並且達到最高點 figure 6-8。苦蕒的蒸餾水抽出物 200, 1000 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，有效的抑制 TNF α 的濃度 $p < 0.05$, $p < 0.01$ (Figure 7-8)。苦蕒的蒸餾水抽出物

200, 1000 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，也可以有效的抑制 IL-1 β 的濃度 $p < 0.05$, $p < 0.01$ (figure 3-4)。但是，在低濃度的情況之下，苦蕒的蒸餾水抽出物 100 mg/kg 在 MSU 注射後之第 2 個小時，無法有效的抑制 TNF α 的濃度 (figure 6) 以及 IL-1 β 的濃度 (figure 2)。

苦蕒是經由何種模式抑制 MSU 誘發的 IL-1 β 及 TNF α 的濃度上升，在本實驗並未能夠充分的說明，我們必須進一步探討，苦蕒蒸餾水抽出物是否與 IL-1 β 及 TNF α 的製造有關。或是苦蕒蒸餾水抽出物可以進一步影響到其他的 cytokine，進而影響到 IL-1 β 及 TNF α 的產生，我們必須要進一步了解其他 cytokine 的改變。IL-8 可能是誘導浸潤白血球 infiltrating neutrophil 的重要調控者。急性之嗜中性白血球依賴性之發生 Acute neutrophil-dependent inflammation 與急性痛風 Acute Gout 有很重要的關聯性。基於此原因，我們必須進一步了解其他 cytokine 的濃度改變。觀察是否其他之 cytokine

(如：IL-8)

會影響急性痛風嗜中性球之移動。

3. 在我們的實驗也發現到經由 MSU 結晶誘導的 air pouch 中其 WBC 在第 6 個小時時達到最高量，而加入苦蕒蒸餾水抽出物，低 100 mg/kg 中 200 mg/kg 高濃度 1000 mg/kg 都可以降低 WBC 的上升。所以，很顯然的 IL-1 β 及 TNF α 的增加與 MSU 結晶所誘導之類急性痛風關節炎，有很大的影響。

本計畫上有諸多未盡事宜，必須在加入更多的研究才可更了解苦蕒在 MSU 誘導之急性痛風所扮演的角色。長期給與大鼠服用苦蕒蒸餾水抽出物之後，是否會降低大鼠產生急性痛風過敏之現象。亦是將來研究的重點。

1. Juang, J.K., H.W., A new compound, Withangulatin A, promotes Type DNA Topoisomerase-mediated DNA damage, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 159, 1128-1134, 1989.
2. Lee, W.C., K.Y. Lin, C.M. Chen. Induction of Heat-Shock Response and Alterations of protein phosphorylation by a novel topoisomerase I inhibitor, Withangulatin A, in 9L rat brain tumor cells, *J. of Cellular Physiology* 149, 66-76, 1991.
3. Lin, Y.S., H.C. Chiang, W.S. Kan, Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L extract, *American Journal of Chinese Medicine*, XX, 233-243, 1992.
4. Chiang, H.S., S.M. Jaw, C.F. Chen, and W.S. Kan, Antitumor agent, Physalin F from *physalis angulata* L. *Anticancer Research*.1992.
5. Kumazawa, Y., K. Mizunoe, and Y. Otsuka, Immunopotentiator separated from hot water extract of the seed of *Benincasa Cerifera* Savi (Tohgasi). *Cancer Immunol. Immunother.*, 19:79-84, 1985.
6. Won, S.J., H.C. Chiang, W.S. Kan and M.T. Lin Augmentation of mouse splenic NK cytotoxic activity by extract of *physalis angulata* L. *J/ Biomed. Lab. Sci.*, 1:83-97, 1988.

7. Terkeltaub, R. C. Zachariae, D. Santoro, J. Martin, P. Peveri, and K. Matsushima. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* 34: 894-903, 1991.
8. Terkeltaub, R. Pathogenesis and treatment of crystal-induced inflammation. In: Koopman W.J., Editor. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. P. 2085-2102.
9. Terkeltaub, R., S. Baird, P. Sears, R. Santiago, and Boissvert, W., The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis, *Arthritis and Rheumatism.*, 41: 900-909, 1998.
10. Phelps, P. McCarty, D.J., Crystal induced inflammation in canine joints. II. Importance of polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 124: 115-126, 1966
11. Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G., and Duff GW, Interleukin 1 (IL-1) as a mediator of crystal arthritis: stimulation of T cell and synovial mitogenesis by urate crystal-induced IL-1, *J. Immunol* 138: 3213-3218, 1987.
12. Di Giovine FS, Malawista SE, Thornton, E., and Duff GW, Urate crystal stimulates production of TNF alpha from human blood monocytes and synovial cells, *J. Clin. Invest.* 87: 1375-1381, 1991.
13. Matsukawa, A., T. Yoshimura, T. Maeda, S. Ohkawara, T. Takahashi, S. Ohkawara and Yoshinaga, M. Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor α , interleukin-1 β , and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis, *Laboratory Investigation*, 78: 559-569, 1998.
14. Matsukawa, A., T. Yoshimura, T. Maeda, S. Ohkawara, K. Takagi, and Yoshinaga, M. Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits: IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 And IL-1 receptor antagonist in vivo, *J. Immunol.* 154: 5418-5425, 1995.
15. Hoch R.C., I.U. Schraufstatter, C.G. Cochrane. In vitro, in vivo, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J. Lab. Clin. Med.* 128: 134-145, 1996.
16. McCarty, D.J., and J.S. Faires, A comparison of the duration of local anti-inflammatory effects of several adrenocortisteroid esters: A bioassay technique, *Curr Ther Res* 5: 284-290, 1963
17. Nickerson-Nutter C.L., E.D., Medvedeff, The effect of leukotriene synthesis inhibitors in models of acute and chronic inflammation, *Arthritis Rheum.* 39: 515-521, 1996.
18. Flick D.A. and Gifford, G.E., Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 68: 167-175, 1984.
19. Matsukawa, A., T., Yoshimura, K. Miyamoto, S., Ohkawara, and Yoshinaga, M. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist and IL-8 in LPS-induced rabbits arthritis. *Lab. Invest.* 76: 629-638, 1997.
20. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F.A. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 96, 99-113, 1949.
21. Hsu, H.Y., Lin, C.C. Chen, J.Y., Yang, J.J. and Zhang, R. Toxic effects of *Erycibe obtusifolia*, a Chinese medicinal herb, in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 62, 101-105, 1998.
22. Burgos, R., Hancke, J., Wilkman, G., Cubillos, V., Caballero, E., Oyarzo, M. and Sanchez, N. Toxicological assessment of *Aralia mandshurica* (Araliaceae) root extract after subchronic administration in rats. A biochemical and histological study. *Phytother. Res.*, 8, 1-9, 1994.
23. Kumazawa, Y., and Otsuka Y., Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato Tohki). *Immunology*, 47: 75-83, 1982.
24. Lin, C.C. Chen, J.Y., Yang, J.J. and Zhang, R. Toxic effects of *Erycibe obtusifolia*, a Chinese medicinal herb, in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 62, 101-105, 1998.
25. Chang W.S., Chang Y.H., Lu F.J. and Chiang H.C. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 14, 501-506, 1994.
26. Badyla S.F., Simmons A., Turek J. and Babbs C.F. Protection from reperfusion injury in the isolated rat heart by postischemic deferoxamine and oxypurinol administration. *Cardiovasc Res.*, 21, 500-506. 1987.
27. Chang W.S., Lee Y.J., Lu F.J. and Chiang H.C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 13, 2165-2170, 1993.
28. Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and chemokines. *Advanced Immunology* 55:97-179, 1999

Figure 1

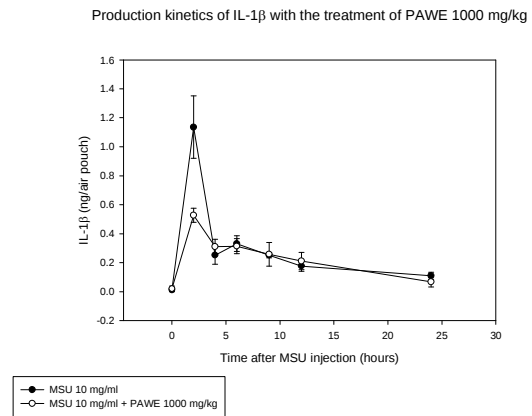
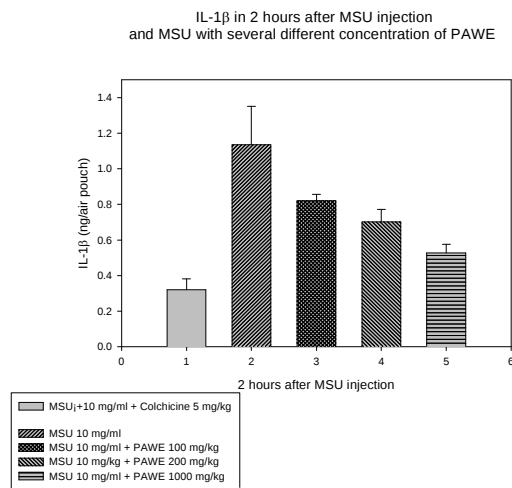
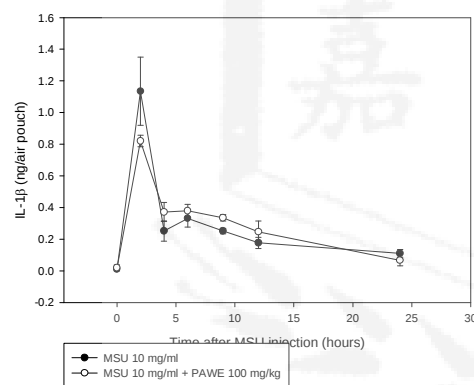


Figure 2

Figure 5

Production kinetic of IL-1 with and without treatment of PAWE 100 mg/kg



TNF α after 2 hours injection of MSU crystal and coadministration with several different concentration of PAWE

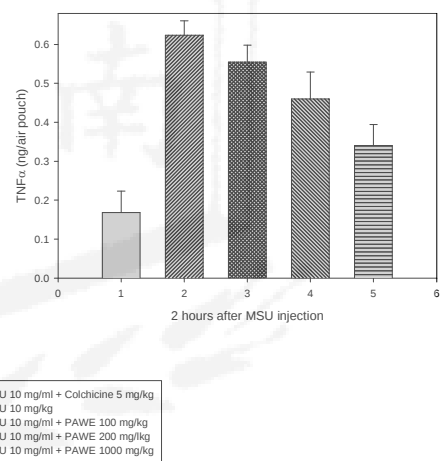
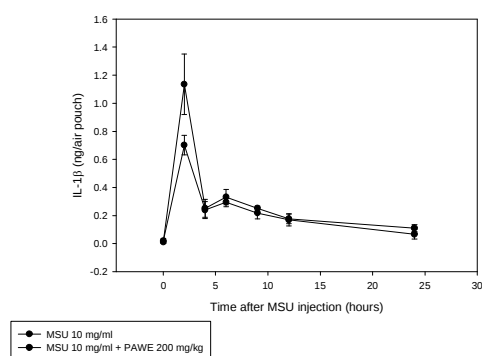


Figure 3

Figure 6

Production kinetic of IL-1 β with and without treatment of PAWE 200 mg/kg



Production kinetics of TNF α with treatment of PAWE 100 mg/kg

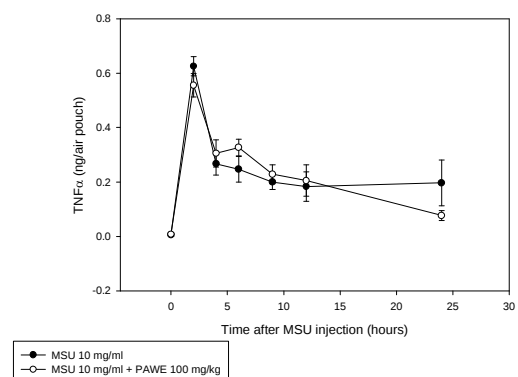


Figure 4

Figure 7

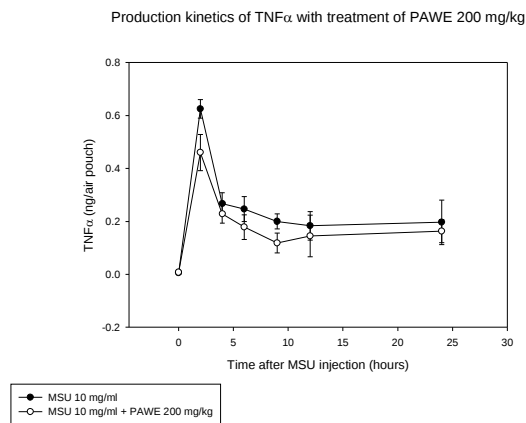


Figure 8

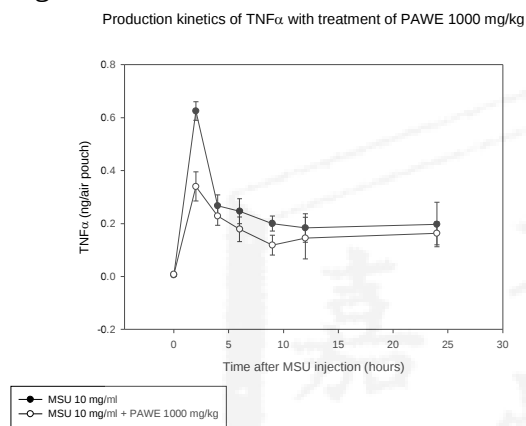


Figure 9

