

실험적 관절염 흰쥐 모델에서 고삼추출액이 척수와 척수신경절의 CGRP 면역반응 신경원에 미치는 영향

신현종 · 이광규 · 육상원¹ · 이상룡² · 고병문³ · 이창현^{3*}

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 원전의사학교실, 2: 경혈학교실, 3: 해부학교실

The Effects of Sophorae radix Extracts on CGRP Immunoreactive Neurons of Spinal Cord and Ganglia in Experimental Arthritic Rat Model

Hyun Jong Shin, Kwang Gyu Lee, Sang Won Ryuk¹,
Sang Ryong Lee², Byung Moon Ko³, Chang Hyun Lee^{3*}

Department of Oriental Pathology, 1: Classics, 2: Meridians, 3: Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the antiinflammatory and analgesic effects of Sophorae radix extracts administered to the arthritic rat model, immunohistochemical stains for CGRP in the L4, L5 and L6 spinal cord and ganglia were done, and paw swelling thickness were measured. Complete Freund's Adjuvant(CFA) were injected to subcutaneous tissue of left foot paw of rats to induce arthritis. Sophorae radix extracts was administered immediately after CFA injection for 10 days. The spinal cord and ganglia were frozen sectioned(30 μ m). These sections were stained by CGRP immunohistochemical staining method, and observed with light microscope. The results were as follows : 1. The change of paw swelling thickness of experimental group decreased from 4 day to 10day after CFA injection compared to control group. 2. The change of differential leukocytes counts of experimental group increased the ratio of lymphocytes, and decreased the ratio of neutrophils compared to control group. 3. The change of CGRP immunoreactive nerve fiber of dorsal horn of experimental group was dense stained compared to control group. 4. The number of CGRP immunoreactive neurons of L4 and L5 spinal cord of experimental group was less than in those control group. These results suggested that Sophorae radix extracts reduces the number of CGRP immunoreactive neurons and nerve fibers of spinal cord and ganglia, and decrease paw swelling thickness in arthritic rat model, which may be closely related to analgesic and antiinflammatory effects of Sophorae radix.

Key words : Sophorae radix extracts, Arthritis, CGRP, Spinal Cord, Ganglia.

서 론

통증을 일으키는 병인은 매우 다양하여 이에 따른 통각 유발기전의 차이가 있어 증상의 경감 및 진통 기전에 대하여는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 통증은 염증반응이 일어날 경우에는 거의 대부분 동반되며 특히 류마티스성 관절염(Rheumatoid arthritis)과 골관절염(osteoarthritis)과 같은 만성적인 염증에서는 통증이 오랫동안 계속된다. 염증과 관련된 통증에 대한 연구는 관절염 모델을 많이 이용하는데 과거에는 염증반응시 염증세포나 주위조직세포에서 만들어진 화학물질들이 유해자극수용기를 활성화시켜 통각을 유발하나 최근에는 이러한 만성통증이 신경

계내부의 변화를 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 생각되고 있다¹⁾. 만성통증 질환의 치료약물을 검정하는데에는 이러한 관절염 모델을 만들어 통증을 전달하는 신경로, 특히 1차 구심신경원인 척수신경절과 척수 뒤뿌의 통증전달 물질들의 변화를 관찰함으로써 효과를 검정할 수 있을 것이다. 한방에서 관절염은 歷節風과 유사한데 역절풍은 正氣가 虛하여 氣血이 부족한데 風寒濕 外邪가 침입하여 血氣가 凝滯해서 관절로 흘러 들어가지 못하고 筋을 滋養하지 못하여 眞氣와 邪氣가 서로 다투어 氣短 · 自汗하면서 전신의 관절에 참을 수 없는 疼痛이 발생하며 屈伸할 수 없는 증상이 나타나는 질환을 말한다. 그 異名으로는 賊風, 痺, 白虎歷節, 痛風 등이 사용되었고 歷節風의 원인으로는 風寒濕 등의 外因과, 氣虛 · 血虛 등의 內因, 瘀血 · 痰飲 등의 不內外因 등으로 나눌수 있다²⁾. 양방에서는 관절염을 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 결정체성 관절병증, 감염성 관절

* 교신저자 : 이창현, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학
E-mail : chlee@woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1559
접수: 2001/11/23 · 수정: 2002/01/18 · 채택 : 2002/02/01

염, 신경병성 관절염 등등으로 나누며 그 원인으로는 노화, 자가 면역, 감염, 내인성 또는 외인성 결정체 등³⁾으로 보고 있다. 관절염에 관한 실험적 연구로는 金⁴⁾이 疎經活血湯合黃連解毒湯으로, 尹⁵⁾이 羌活湯 및 加味羌活湯으로, 李⁶⁾가 行濕流氣散으로, 安⁷⁾이 鍼灸刺戟 및 疎風活血湯加味方으로, 盧⁸⁾가 生草烏와 法製草烏水鍼으로, 徐⁹⁾가 獨活寄生湯加貓脛骨로 각각 흰쥐에 미치는 영향을 보고한 바 있는데 각종 약물처방 혹은 水鍼, 침구자극을 이용한 치료에 효과의 확인이 있었다. 관절염과 통증을 연구하는데 이용되는 실험동물 모델은 collagen으로 유도한 관절염 모델과 adjuvant를 이용한 모델을 이용한다. 이들 중 adjuvant 관절염 모델은 실험동물의 피부에 결핵균의 유화 혼합액인 Complete Freund,s Adjuvant(CFA)를 주사하여 다발성 관절염을 야기시킨 모델로서 관절염과 통증 치료 효과를 검증하는데 많이 이용된다. 동물에서 통증을 측정하는 방법은 유해자극을 회피하려는 행동을 계량화하는 방법과 전기생리학적으로 신경전도속도를 측정하는 방법이 많이 사용되고 있다. 그러나 최근에는 종양유전자인 c-fos의 생산물질인 c-fos 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 방법과¹⁰⁾ 통증전달에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 calcitonin gene-related peptide(CGRP)의 척수 뒤뿌내 농도를 면역조직화학적으로 염색하여 그 변화를 관찰하는 방법¹¹⁾이 통증의 정도와 진통효과를 검증하는 방법으로 흔히 사용하고 있다. 통증전달에 관련된 신경전달물질로는 11개의 아미노산으로 구성된 peptide인 substance P가 가장 유력한 물질로 보고되어있다¹²⁾. 척수내에서 통각을 조절하는 것으로 추측되는 구조인 아교질(substantia gelatinosa)에는 substance P를 함유한 신경종말이 많이 분포되어 있으며¹³⁾, 생리화적으로도 substance P가 통각전달에 관여한다는 여러 가지 증거가 보고되었다¹⁴⁾. CGRP는 calcitonin과 같은 유전자부위에서 나오는 일종의 신경펩타이드로 이를 함유한 신경종말이 여러 말초신경에 분포하며, 통각을 전달한다고 알려진 무수초신경섬유인 C섬유와 얇은 유수초신경섬유인 Aδ섬유에서만 발견된다고 하였다¹⁵⁾. 또한 CGRP는 통각에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 같이 척수신경절의 신경원에서 발견되며, 척수 뒤뿌의 1차구심성 섬유에만 있는 것으로 보고된 펩타이드이다. 관절염의 치료에 있어서 한방에서는 비록 상기한 바와 같이 다양한 원인으로 보고 있으나 風寒濕熱의 邪氣가 주된 원인인 것으로 보아 그 치료법은 주로 散風清熱祛濕시키는 방법을 사용¹⁶⁾하고 있다. 이에 저자는 그 性味가 苦寒^{17-22,23,24)} 無毒^{17-19,23,25)}하고 清熱燥濕, 祛風殺蟲^{19,22,23,25)}, 利尿, 治熱痢^{19,20)}, 消腫作用²⁶⁾ 등이 있는 고삼을 사용하여 실험적 관절염모델에 미치는 영향을 조사하고자, 통증과 관련된 펩타이드중 척수와 척수신경절내 신경원에서 CGRP에 면역반응을 나타내는 신경원과 신경섬유의 변화를 관찰함으로써 실험적 관절염 유발 후 통증 억제와 항염증 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 130-150g의 숫컷 Sprague-Dawley rats를

이용하였다. 실험동물은 1)관절염을 일으키지 않고 vehicle을 주입한 정상군 6마리 2) 실험적 관절염을 유발한 대조군 6마리 및 3) 실험적 관절염을 유발한 후 고삼전탕액을 투여한 실험군 6마리를 이용하였으며 실험개시 후 10일째에 희생시켜 관찰하였다.

2. Complete Freund,s Adjuvant로 유도한 관절염 모델

실험적 관절염 모델은 Colpaert 등²⁷⁾의 방법에 따라 5mg의 CFA(Complement Freund,s Adjuvant, Difco, Detroit, MI)를 파라핀 oil에 녹여 대조군과 실험군의 흰쥐 좌측 발바닥의 피하에 50ul(250μg/마리)를 주사하였다. 주사 후 1일째부터 10일째까지 발바닥 부종의 두께를 검사하여 관절염유발 정도를 관찰하였다. 발바닥 부종(paw swelling)의 두께는 버니어캘리퍼스를 이용하여 관절염이 유발된 쪽의 뒷다리 발바닥의 두께를 2번씩 측정하여 평균값을 구하여 이용하였다. 정상군에는 실험군과 유사하게 무균시킨 vehicle을 동량 주입한 후 같은 방법에 의하여 측정하여 비교하였다.

3. 고삼 전탕액의 제조 및 투여

실험군에 투여하는 고삼전탕액은 고삼 200g을 3L 플라스크에 증류수 1500ml와 함께 넣은 다음 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 후 3,000rpm으로 30분간 원심분리한 다음 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축하여 200ml가 되게하여 검액으로 사용하였다. 실험군은 흰쥐 체중 100g당 1.0ml를 10일간 복강에 주사하였으며, 정상군과 대조군에는 동량의 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

4. 혈액채취

혈액의 채취는 실험 종료 후 10일째에 모든 군의 흰쥐를 마취시킨 상태에서 heparin을 도포한 주사기를 이용하여 심장의 좌심실에서 2ml씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 즉시 10장의 슬라이드에 smear(도포)한 후 통상적인 방법에 의하여 wright,s stain을 한 후 differential leukocytes count를 시행하여 백혈구 수의 변화를 관찰하였다.

5. 조직 표본제작

실험동물을 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채취한 후 심장을 통하여 방혈과 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1 M sodium phosphate buffer(PB)에 heparin(1000IU/1000ml)을 섞은 용액을 10분간 관류시키고 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 30분간 관류시킨다. 관류고정이 끝난 후 척수(L4-6) 및 척수신경절(L4-6)을 적출한 다음 동일 고정액에 4℃에서 4시간 동안 담구어 후고정을 시행하였다. 그후 다시 0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 동안 담구어 보관하였다. 보관된 척수와 신경절들은 동결절편기(Leica, JungCM3000, Germany)를 이용하여 약 30μm 두께의 횡단연속절편을 만들어 6-well plate에 순서대로 보관한 후 free floating method로 CGRP 면역조직화염색을 시행하였다.

6. 면역조직화학 염색

박절된 척수와 신경질의 CGRP 면역조직화학염색을 위해 박절된 조직을 0.1M phosphate buffer(PB)로 세척한 후 조직 절편내에 내재되어있을 peroxidase를 제거하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide로 처리하고 1% normal goat serum과 0.3% triton X-100으로 1시간 처리하여 비특이성 항원의 반응을 제거하였다. CGRP 염색은 1:4000으로 희석한 일차항체(rabbit anti-CGRP)에 조직절편들을 담구어 실온에서 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차항체의 희석은 0.1M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다.

그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1M PB로 세척하였으며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc.)를 1:200으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1M PB로 수세과정을 거친후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담구어 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30mg의 3-3' diaminobenzidine을 150 ml의 0.1M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러차례 수세하고 1% OsO₄ 용액으로 신경세포체와 신경섬유의 염색성을 증가시킨 후에 gelatin 이 입혀진 슬라이드위에 차례대로 얹어 4℃에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene으로 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 관찰

L4, L5 및 L6 척수의 뒤뿌리에 염색된 CGRP의 염색성을 관찰하기 위하여 척수의 천층 회색질을 외측부위, 중간부위 및 내측부위로 나누어 관찰하였다. 또한 L4, L5 및 L6의 척수신경절내 CGRP에 면역염색된 신경원을 계수하여 각 군별로 통계 분석하였다.

결 과

1. 흰쥐 발바닥 부종의 두께변화

흰쥐의 좌측 발바닥에 CFA를 주입한 후 1일째부터 10일째 까지 10일간 좌측 발바닥의 두께의 변화를 관찰하였다. 관절염을 유발시킨 대조군(관절염 유발후 생리식염수 투여군)과 실험군(고삼추출액 투여군)에서는 관절염 유발 후 4, 5, 6 및 7일째에 가장 심하게 염증반응이 유발되어 대조군의 발바닥 두께인 4.32 ± 0.21mm보다 약 2.25mm 증가한 후 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 실험 5일째의 대조군의 발바닥 부종의 두께는 6.54 ± 0.74mm이었으나 실험군에서는 5.98 ± 0.68mm로 약 0.56mm가 감소하기 시작하였다. 그 후 계속 감소하여 실험 10일째의 대조군에서는 5.51 ± 0.19mm이었으나 실험군에서는 4.86 ± 0.39mm로 약 0.65mm가 감소하였다(Table 1).

Table 1. The effects of Sophorae radix extracts on the change of paw swelling thickness in arthritic rats

Group	Day				
	1	3	5	8	10
Normal ^{a)}	4.32±0.2	4.15±0.2	4.08±0.36	4.10±0.3	4.11±0.19
Control ^{b)}	5.96±0.72	6.35±1.01	6.54±0.74	5.97±0.26	5.51±0.19
Experimental ^{c)}	5.74±0.27	6.32±0.52	5.98±0.68	5.41±0.37	4.86±0.39

a) : normal group(vehicle injection + saline treated group), b) : control group(CFA injection + saline treated group), c) : experimental group(CFA injection + Sophorae radix extracts treated group). The values are mean± SE for 6 experiments

2. 혈액내 백혈구 백분율의 변화

관절염 유발 후 10일째 정상군, 대조군 및 실험군의 혈액내 백혈구 백분율을 관찰한 바 정상군은 림프구 85.1%, 호중구 7.6%, 단핵구 5.3%, 호산구는 2.0%이었으나 대조군에서는 림프구 60.4%, 호중구 32.7%, 단핵구 5.5%, 호산구는 1.4%로서 림프구의 비율은 감소하였으나 상대적으로 호중구의 비율은 증가하는 경향을 나타내었다. 관절염유발후 고삼추출액을 투여한 실험군에서는 림프구 69.2%, 호중구 24.3%, 단핵구 5.8%, 호산구는 0.7%로서 대조군에 비하여 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구 비율은 감소하는 경향을 나타내었다(Table 2).

Table 2. The effects of Sophorae radix extracts on the change of differential leukocytes count in arthritic rat blood.

Group	Differential Leukocytes Count(%)				
	Lymphocyte	Neutrophil	Monocyte	Eosinophil	Basophil
Normal	85.1	7.6	5.3	2.0	0
Control	60.4	32.7	5.5	1.4	0
Experimental	69.2	24.3	5.8	0.7	0

The legends are the same as the table 1.

3. 척수 뒤뿌리의 CGRP 면역반응 섬유의 변화

10일째에 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿌리 천층의 변화를 관찰하기 위하여 뒤뿌리를 외측부분, 중간부분 및 내측부분으로 나누었다. 정상군의 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿌리 천층의 CGRP 면역반응 신경 섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 관절염을 유발한 대조군과 실험군에서는 관절염을 유발한 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군과 실험군을 비교하면 대조군이 실험군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다(Table 3, Fig. 1-4).

Table 3. The density of CGRP immunoreactive nerve fibers of L4, L5 and L6 superficial dorsal horn after administration of Sophorae radix extracts.

Group	Density of CGRP Immunoreactive Nerve Fibers		
	L4		
	Lat/Mid/Med	L5	L6
Normal	+++++	+++++	+++++
Control	+++++/+	+++++/+	+++++/+
Experimental	+++++	+++++	+++++

The legends are the same as the table 1. Lat: lateral part of dorsal horn, Mid: middle part of dorsal horn, Med: medial part of dorsal horn



Fig. 1. The photomicrographs of control group show a section of the lumbar dorsal horn(L5) 10day after the induction of arthritis by injection of Complete Freund,s Adjuvant(CFA) into foot pad. The section is immunohistochemically stained for CGRP immunostained fibers, which is increased on the inflamed side(right) as compared with normal side(left).



Fig. 3. The photomicrographs of control group show a section of the lumbar dorsal horn(L6) 10day after the induction of arthritis by injection of and Complete Freund,s Adjuvant(CFA) into foot pad. The section is immunohistochemically stained for CGRP immunostained fibers, which is increased on the inflamed side(left) as compared with normal side(right).



Fig. 2. The photomicrographs of experimental group show a section of the lumbar dorsal horn(L5) 10day after the induction of arthritis by injection of Complete Freund,s Adjuvant(CFA) into foot pad. The section is immunohistochemically stained for CGRP immunostained fibers, which is increased on the inflamed side(left) as compared with normal side(right).



Fig. 4. The photomicrographs of experimental group show a section of the lumbar dorsal horn(L6) 10day after the induction of arthritis by injection of Complete Freund,s Adjuvant(CFA) into foot pad. The section is immunohistochemically stained for CGRP immunostained fibers, which is increased on the inflamed side(left) as compared with normal side(right).

4. 척수 신경절내 CGRP 면역반응 신경원의 변화

10일째에 L4, L5 및 L6의 척수신경절 신경원의 CGRP 면역반응 세포를 계수하여 관찰한 바 정상군의 L4 척수신경절의 CGRP 면역반응세포는 27.8 ± 5.4 개(n=6)이었으나 대조군에서는 75.8 ± 6.4 개(n=6)로 관절염 유발 후 CGRP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였다. 그러나 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 59.2 ± 5.4 개(n=6)로 정상군에 비하여 증가하였으나 대조군에 비하여는 감소하였다. L5 척수신경절에서는 정상군에서는 41.4 ± 7.5 개(n=6)이었으나 대조군에서는 50.2 ± 2.5 개(n=6)로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 45.4 ± 4.3 개로 대조군에 비하여 약간 감소하였다 (Table 4, Fig. 5-6).

Table 4. The number of CGRP immunoreactive neurons of L4, L5 and L6 spinal sensory ganglia after administration of Sophorae radix extracts.

Group	Number of CGRP Immunoreactive Neurons		
	L4	L5	L6
Normal	27.8 ± 5.4	41.4 ± 7.5	26.9 ± 3.3
Control	75.8 ± 6.4	50.2 ± 2.5	47.2 ± 5.0
Experimental	59.2 ± 5.4	45.4 ± 4.3	41.3 ± 3.5

The legends are the same as the table 1.



Fig. 5-6. The photomicrographs show a section of the lumbar spinal ganglion(L6) 10day after the induction of arthritis by injection of Complete Freund,s Adjuvant(CFA) into foot pad. The section is immunohistochemically stained for CGRP immunostained neurons, which is increased on the control group(Fig. 5) as compared with experimental group(Fig. 6).

고찰

한방에서 관절염은 歷節風과 유사한데 역질풍은 正氣가 虛하여 氣血이 부족한데다 風寒濕 外邪가 침입하여 血氣가 凝滯해서 관절로 흘러 들어가지 못하고 筋을 滋養하지 못하여 眞氣와 邪氣가 서로 다투어 氣短·自汗하면서 전신의 관절에 참을 수 없는 疼痛이 발생하며 屈伸할 수 없는 증상이 나타나는 질환을 말한다. 그 異名으로는 賊風, 痺, 白虎歷節, 痛風 등이 사용되었고 歷節風의 원인으로는 風寒濕 등의 外因과, 氣虛·血虛 등의 內因, 瘀血·痰飲 등의 不內外因 등으로 나눌 수 있다²⁾. 관절염에 대한 실험적 연구는 金⁴⁾이 疎經活血湯合黃連解毒湯이 消炎效果와 鎮痛效果에 유효함을 보고하였고, 李⁵⁾는 行濕流氣散 투여가 백혈구수와 ESR(Erythrocyte Sedimentation Rate)에 유의성있는 감소가 있음을 보고하였으며, 安⁷⁾은 鍼灸刺戟 및 疎風活血湯加味方 투여로 ESR과 CRP(C-Reactive Protein)의 유의성 있는 감소와 RBC(Red Blood Cell) Count의 유의성있는 증가를 보고하였다. 苦蔘은 神農本草經에 처음 기재되어 있으며 中品²⁶⁾에 배속되었다. 그 異名은 水槐^{17-19,26)}, 地槐^{17-19,22,25,26)}, 菟槐^{17,19)}, 野槐^{17,19,26)} 등이며, 이 약은 豆科에 속한 多年生 草本인 苦蔘의 根을 건조한 것으로 봄과 가을에 채취하여 曬乾^{17-19,22,23,24,26)}한다. 그 性味는 苦寒¹⁷⁻²⁴⁾ 無毒^{17-19,23,25)}하며 清熱燥濕, 祛風殺蟲¹⁹⁻²⁵⁾, 利尿, 治熱痢^{19,20)}, 消腫作用²⁶⁾ 등의 효과가 있다. 그러므로 이와 같은 고삼의 효능을 실험적으로 규명하고자 고삼추출액을 흰쥐 관절염모델에 주입하여 통증과 관련된 신경전달물질과 신경원의 변화를 조사하였다. 관절염과 통증 실험동물 모델을 이용한 연구는 *Mycobacterium butyricum*을 기름에 용해하여 흰쥐의 꼬리 저부의 피하에 주입하면 3-4주간 지속되는 다발성 관절염이 야기된다²⁸⁾. Carrageenan에 의한 관절염 모델에서는 대퇴골 관절연골의 두께와 대퇴골과 경골의 골단판의 두께가 감소하고 경골의 연골판 아래의 골조직과 활액막의 세포층의 수가 감소한다고 하였다²⁹⁾. 또한 antigen(methylated bovine serum albumin)에 의한 관절염 유발(류마티오이드 관절염 모델)시 관절연골의 부식이 일어나며, 야기 후 1일째에 비만세포의 출현빈도가 감소하며 약 14일 동안 계속 감소한 상태로 유지하나 염증기전과는 관계가 없다고 하였다³⁰⁾. 본 실험에서 흰쥐의 좌측 발바닥에 CFA를 주입한 후 10일간 좌측 발바닥의 두께의 변화를 관찰한 바 관절염을 유발시킨 대조군과 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 관절염 유발 후 4, 5, 6 및 7일째에 가장 심하게 염증반응이 유발되어 정상군의 발바닥 두께인 $4.32 \pm 0.21\text{mm}$ 보다 약 2.25mm 증가한 후 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 실험 4일째의 대조군의 발바닥 부종의 두께는 $6.52 \pm 0.69\text{mm}$ 이었으나 실험군에서는 $5.95 \pm 0.83\text{mm}$ 로 약 0.57mm 가 감소하기 시작하였다. 그 후 계속 감소하여 실험 10일째의 대조군에서는 $5.51 \pm 0.19\text{mm}$ 이었으나 실험군에서는 $4.86 \pm 0.39\text{mm}$ 로 약 0.65mm 가 감소함으로써 본 실험의 실험군 즉 고삼전탕액이 항염증 작용이 있을 것으로 생각된다. 본 실험의 관절염 유발 후 10일째 정상군, 대조군 및 실험군의 혈액내 백혈구 백분율을 관찰한 바 정상군은 림프구 85.1%, 호중구 7.6%, 단핵구 5.3%, 호산구는 2.0%이었으나 대조

군에서는 림프구 60.4%, 호중구 32.7%, 단핵구 5.5%, 호산구는 1.4%로서 림프구의 비율은 감소하였으나 상대적으로 호중구의 비율은 증가하는 경향을 나타내었다. 관절염유발후 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 림프구 69.2%, 호중구 24.3%, 단핵구 5.8%, 호산구는 0.7%로서 대조군에 비하여 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구 비율은 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 감염증, 외상, 동맥주위염 등과 같은 급성염증시 백혈구의 수가 증가한다는 보고와 유사하게 대조군에서는 증가하였으나 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 호중구의 수가 감소하여 항염증 치료 효과가 있음을 알 수 있었다. 통증과 관련된 신경전달물질로는 Calcitonin과 같은 유전자 부위에서 나오는 일종의 신경 peptide인 calcitonin gene-related peptide(CGRP)는 통각 전달에 상승작용을 일으키며³¹⁾, 이를 함유한 신경종말이 여러 말초신경에 분포하는데 이러한 신경섬유는 통각전달에 관여하는 무수초신경섬유인 c 섬유와 얇은 유수초신경섬유인 δ 섬유에서만 발견된다³²⁾. 이는 통각에 관여하는 신경전달물질인 substance p와 같이 척수신경절 신경원에서 발견되며³³⁾, 척수 뒤뿔의 일차 구심성섬유에만 있는 것으로 보고된 유일한 신경섬유이다. 흰쥐의 등에 Complete Freund's Adjuvant를 피부 아래에 주입하면 polyarthritis가 유발되어 척수와 척수신경절 내에 calcitonin gene-related peptide(CGRP)가 약 50%가 증가한다³⁴⁾. Kaolin과 carrageenan을 흰쥐 슬관절에 주입하여 실험적으로 관절염을 유발하면 천층의 척수 중간부분(middle portion)에 CGRP의 농도가 증가한다고 하였다³⁵⁾. 실험적으로 야기한 관절염 모델에서 synovium의 혈관주위에서 NGF(Nerve Growth Factor)의 증가가 초래된다고 하였고 synovium에서 정제한 NGF를 주입하면 염증을 일으키지 않는다고 하였다. 또한 말초의 교감신경계를 파괴하면 관절염 유발시 염증과 NGF level을 감소시킨다고 하였다³⁶⁾. 본 실험에서는 정상군의 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿔 천층의 CGRP 면역반응 신경섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 관절염을 유발한 대조군과 실험군에서는 관절염을 유발한 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군과 실험군을 비교하면 대조군이 실험군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다. 또한 본 실험의 10일째에 L4, L5 및 L6의 척수신경절 신경원의 CGRP 면역반응 세포를 계수하여 관찰한 바 정상군의 L4 척수신경절의 CGRP 면역반응세포는 $27.8 \pm 5.4\text{개}(n=6)$ 이었으나 대조군에서는 $75.8 \pm 6.4\text{개}(n=6)$ 로 관절염 유발 후 CGRP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였다. 그러나 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 $59.2 \pm 5.4\text{개}(n=6)$ 로 정상군에 비하여 증가하였으나 대조군에 비하여는 감소하였다. L5 척수신경절에서는 정상군에서는 $41.4 \pm 7.5\text{개}(n=6)$ 이었으나 대조군에서는 $50.2 \pm 2.5\text{개}(n=6)$ 로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 고삼전탕액을 투여한 실험군에서는 $45.4 \pm 4.3\text{개}$ 로 대조군에 비하여 약간 감소하였다. 이상의 실험 결과는 통증과 관련된 CGRP 면역반응 신경섬유 및 척수신경절에서의 신경원의 숫적 변화는 고삼전탕액을 투여한 실험군에서 대조군보다 약하게 염색되거나 숫적으로 감소한 것은 고삼이 통증의

역제와 관련이 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 고삼전탕액은 CFA 관절염 모델에서 부종감소, 항염증 및 통증억제 효과가 있을 것으로 사료된다.

결론

흰쥐의 좌측 발바닥에 Complete Freund's Adjuvant를 주입하여 실험적으로 관절염을 야기시켜 고삼전탕액을 투여한 후 항염증 효과를 관찰하기 위하여 좌측 발바닥의 두께, 백혈구백분율, CGRP 신경원 및 신경섬유의 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 흰쥐 발바닥부종의 두께변화는 실험4일째부터 10일째의 실험군에서 대조군보다 0.57-0.65mm가 감소하였다. 혈액내 백혈구 백분율의 변화는 실험군이 대조군보다 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구의 비율은 감소하였다. 척수 뒤뿌의 CGRP 면역반응 섬유의 변화는 대조군이 실험군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다. 척수 신경절내 CGRP 면역반응 신경원의 변화는 L4와 L5의 척수신경절에서 CGRP에 면역반응된 신경원의 수는 실험군이 대조군보다 감소하였다. 이상의 실험결과로 고삼추출액은 실험적 흰쥐 관절염 모델에서 척수와 척수신경절의 CGRP 면역반응 세포의 수와 신경섬유의 염색성을 감소시켰으며, 또한 발바닥 부종의 두께를 감소시킴으로써 항염증 및 통증억제 기능이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었음

참고문헌

1. Wells, W.E. : A review of the chronic pain syndromes : etiology, transmission and treatment. *Crna* 4, 187-198, 1993.
2. 정우열 : 「동의보감」의 질병분류에 대한 연구(3), *대한동의생리병리학회지* 15, 1-3, 2001.
3. 대한병리학회 대구·경북지부학회: *간추린 병리학*, 서울, 정문각, pp.514-515, 2000.
4. 金荷中 : Adjuvant關節炎에 疎經活血湯合黃連解毒湯이 미치는 實驗的 研究, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1992.
5. 尹英姬 : 羌活湯 및 加味羌活湯이 鎮痛效果와 Adjuvant 關節炎 白鼠에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1993.
6. 李世鉉 : 行濕流氣散이 Adjuvant 關節炎에 미치는 實驗的 研究, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1992.
7. 安仙禧 : 鍼灸刺戟 및 疎風活血湯加味方 投與가 류마티스性 關節炎 患者의 血液에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 석사학위논문, 1994.
8. 盧富來 : 生草烏와 法製草烏水鍼이 흰쥐의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1994.
9. 徐海卿 : 獨活寄生湯加猫脛骨이 Adjuvant 關節炎에 미치는 實驗的 研究, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1998.
10. Abbadie, C., Besson, J.M. : effects of morphine and naloxone on basal and evoked Fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats. *Pain* 52, 29-39, 1993.
11. Zhang, R.X., Mi, Z.P., Qiao, J.T. : Changes of spinal substance P, calcitonin gene-peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin induced pain. *Regul. Pept.* 51, 25-32, 1994.
12. Pernow, B. : Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35, 86-141, 1983.
13. Jessel, T.M., Tsungo, A., Kanazawa, I., Otsuka, M. : Substance P depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res.* 168, 247-295, 1979.
14. Henry, J.L. : Effects of substance P on functionary identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* 114, 439-451, 1976.
15. McNeil, D.L., Coggeshal, R.E., Carlton, S.M. : A light and electron microscopic study of calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of the rat. *Exp. Neurol.* 99, 699-708, 1988.
16. 全國韓醫科大學 再活醫學科學教室 : *東醫再活醫學科學*, 서울, 書苑堂, pp95-96, 1995.
17. 李時珍 : *本草綱目*, 臺北, 金氏印刷公司, pp54-55, 1975.
18. 許浚 : *東醫寶鑑*, 서울, 南山堂, p726, 1989.
19. 朱榮丞 外 : *本草學*, 서울, 永林社, p186, 1995.
20. 戴新民 : *現代本草 中國藥材學*, 臺北, 啓業書局, p564, 1987.
21. 黃度淵 : *國譯編註方藥合編*, 서울, 永林社, p544, 1991.
22. 全國中草藥匯編寫組 : *全國中草藥匯編*, 北京, 人民衛生出版社, p517, 1975.
23. 辛民教 : *原色臨床本草學*, 서울, 永林出版社, p314, 1989.
24. 醫聖堂編輯部 : *校正 中藥大辭典*, 서울, 醫聖堂, pp1368-1369, 1994.
25. 안덕균 외 : *현대본초학*, 서울, 교문사, p411, 1975.
26. 中國醫學科學院 藥物研究所 等 : *中藥志(第一冊)*, 北京, 人民衛生出版社, pp193-196, 1979.
27. Colpaert, F.C. : Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain* 28, 201-222, 1987.
28. Calvine, B., Villanueva, L., Le Bars, D. : Dorsal horn (convergent) neurons in the intact anesthetized arthritic rat. 1. Segemntal excitatory influences. *Pain* 28, 81-98, 1987.
29. Hansra, P., Moran, E.L., Fornasier, V.L., Bogoch, E.R. : Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation* 24, 141-155, 2000.
30. Tiggelman, A.M., Van Noorden, C.J. : Mast cells in early stages of antigen-induced arthritis in rat knee joints. *Int. J. Exp. Pathol.* 71, 455-464, 1990.

31. Wiesenfeld-hallin, Z. : Somatostatin and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate spinal sensory and reflex mechanism in the rat: behavioral and electrophysiological studies. *Neurosci. Lett* 67, 319-323, 1986.
32. McNeill, D.L., Coggeshall, R.E., Carlton, S.M. : A light and electron microscopic study of calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of the rat. *Exp. Neurol.* 99, 699-708, 1988.
33. Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. : Calcitonin gene-related peptide coexist with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptide* 6, 747-754, 1985.
34. Collin, E., Mantelet S., Frechilla, D., Pohl, M., Bourgoin, S., Hamon, M., Cesselin, F. : Increased in vivo release of calcitonin gene related peptide-like material from the spinal cord in arthritic rats. *Pain* 54, 203-211, 1993.
35. Sluka, K.A., Westlund, K.N. : Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 55, 367-377, 1993.
36. Aloe, L., Tuveri, M.A., Levi-Montalcini, R. : Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation. *Rheumatol. Int.* 12, 213-216, 1992.