

원 저

烏藥順氣散加味方の 抗炎作用과 Collagen誘發 關節炎의 發生抑制 및 治療效果

이찬범, 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Anti-inflammation, Anti-Development and Curative Effects of *Oyaksunki sangamibang* on the Collagen-Induced Arthritis in Rats

Chan-Bum Lee, Min-Suck Oh

Dept. of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Seoul, Korea.

Objectives : This study was carried out to investigate the anti-inflammation, anti-development and curative effects of *Oyaksunki-sangamibang* (OSKM) on collagen-induced arthritis in Wistar rats and ICR mice.

Materials & Methods : In experiment part II, the inhibitory effects of nitric oxide synthesis, pro-inflammatory cytokines, and cyclooxygenase were studied.

In experiment part II, paw edema volume and thickness of ankle joint were measured at 0, 10, 15, and 20 days after immunization. The incidence and arthritis score were evaluated 14 days after immunization. At 15 days after immunization, serum TNF- α was analyzed.

In experiment part III paw edema volume and thickness of ankle joint were measured at 0, 10, and 15 days after treatment. At 15 days after treatment, serum TNF- α was analyzed.

Results : In experiment part I:

1. Nitric oxide synthesis and pro-inflammatory cytokines were inhibited significantly by OSKM extract.
2. Cyclooxygenase 2 (COX-2) was inhibited by OSKM extract.

In experiment part II:

Paw edema volume, thickness of ankle joint, and serum TNF- α level of the treated group were significantly decreased compared with the control group at 20 days after immunization.

In experiment part III:

Incidence of arthritis was 70 %. OSKM-treated group had no significant change on paw edema volume, thickness of ankle joint and serum TNF- α level.

Conclusions : These results indicated that OSKM has anti-inflammation effects on the ICR mouse, and higher inhibitory effects on the onset but lower inhibitory effects on the progression of collagen-induced arthritis in rats.

Key Words: *Oyaksunki-sangamibang* (OSKM), collagen-induced arthritis, anti-inflammation.

緒 論

· 접수 : 2005년 6월 10일 · 논문심사 : 2005년 7월 16일
 · 채택 : 2005년 8월 18일
 · 교신저자 : 오민석, 충북청주시 상당구 용담동 173-9 대전대학교 청주 한방병원 특진과
 (Tel : 043)229-3700, Fax : 043)253-8757, E-mail : ohmin@dju.ac.kr

痺는 氣가 막혀서 잘 통하지 않는다는 뜻이다¹⁾. 痺證에 대하여 가장 먼저 언급된 곳은 《黃帝內經》²⁾으로, <素問·五臟生成篇>에서 ‘臥出而風吹之 血凝

Table 1. Prescription of Oyakunki-sangamibang(OSKM)

Herb name	Scientific name	g/pack
烏藥	<i>Lindera strychnifolia</i> Villar	8
陳皮	<i>Citrus tangerina</i> Hort. et Tanaka	8
半夏	<i>Pinellia temata</i> Breitenbach	8
麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	8
川芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino	8
白芷	<i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hook.	8
白僵蠶	<i>Bombyx mori</i> L.	8
枳殼	<i>Citrus aurantium</i> L.	8
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	8
羌活	<i>Notopterygium incisum</i> Ting	8
獨活	<i>Heracleum lanatum</i> Michx.	8
木瓜	<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	8
赤茯苓	<i>Poria cocos</i> Wolf	8
乾薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	8
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl.	8
甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	8
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	8
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>intermis</i>	8
Total amount		144

於膚者爲痺'라 하고 <素問·痺論>에서 '風寒濕三氣雜至 合而爲痺也'라 하였다. 이후 痺證은 後世에 痛痺, 痛風, 歷節風 등으로 증상에 따라 명칭이 혼용되었는데, 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎 혹은 正氣虛弱한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 關節에 凝滯됨으로써 血氣運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利, 심하면 關節의 강직성 변형을 초래하게 되는 질환^{3,4)}으로, 서양의학에서 말하는 류마티드 關節염, 통풍, 퇴행성 關節염, 폐색성혈전혈관염, 경피증, 전신성 홍반성낭창, 근염 등의 증상과 유사하다⁵⁾. 痺證의 치료는 氣血과 營衛가 순행하면 痺痛이 자연스럽게 소실되므로⁶⁾ 宣通이 기본이 되는데⁷⁾, 일체의 風疾에 疏通氣道를 위해 우선 사용하며^{5,6)} 關節염에 활용되는^{7,10)} 烏藥順氣散에 주목하게 되었다.

烏藥順氣散은 宋代《太平惠民和劑局方》⁸⁾에 처음으로 수록된 처방으로, 一切風氣가 攻注四肢하여 骨節疼痛하거나 遍身頑麻하는 경우에 활용되는데, 실험적 연구로 李¹¹⁾는 염증 반응의 초기에 혈관의 투

과성이 항진되는 것을 억제하는 작용이 있음을, 李¹²⁾는 H₂O₂에 의해 손상된 척수감각신경세포의 보호효과가 있음을 보고하였으나, 關節염 및 류마티드 關節염에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 烏藥順氣散加味方이 염증에 미치는 영향을 연구하고자 nitric oxide(NO) 생성억제력, 염증관련 cytokine 유전자 발현억제력, cyclooxygenase II(COX-2)를 평가하고, 烏藥順氣散加味方이 collagen 유발 關節염의 발생억제와 치료에 미치는 영향을 연구하고자 collagen으로 關節염을 유발시킨 후는 물론 유발단계부터 실험쥐에게 약재를 투여하여 關節염의 발생억제와 치료에 미치는 효과를 형태학적, 혈청학적으로 측정할 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 動物

烏藥順氣散加味方이 collagen 유발 關節염의 발생

억제와 치료효과에 미치는 영향을 평가하기 위한 실험에는 체중 230g 내외의 수컷 Wistar rat (샘타코, 한국)을, 염증억제력 평가를 위한 실험에는 생후 5주령된 ICR mouse (대한실험동물, 한국)를 구입해 사용하였다. 실험동물의 사육조건은 온도 23±2℃, 습도 55±5%, 조명 12시간 cycle(07:00-19:00), 조도 200-250Lux의 조건에서 고품사료(조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.0% 이상, 조회분 10.0% 이상, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상; 제일사료, 한국)와 물을 자유 섭취토록 하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중의 변화 등에 이상이 없는 동물만을 선택하여 실험에 사용하였다.

2. 藥材

실험에 사용된 약재는 烏藥順氣散에 半夏, 羌活, 獨活, 木瓜, 赤茯苓, 桂枝를 加한 것으로 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다. 1貼의 처방내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

3. 檢液의 製造

In vivo 실험에는 烏藥順氣散加味方 1첩 분량을 2,000ml의 증류수에 1시간 동안 沈漬시킨 후, 2시간 30분 동안 전탕하고, 전탕액을 여과포로 여과한 후 감압농축기를 이용해 300ml로 농축하여 사용하였다.

In vitro 실험에는 상기처방 1첩 분량의 약재를 100-200메쉬 크기로 분쇄시킨 후 95% ethanol 약

Table 2. Inhibitory Effects of NO Synthesis by OSKM

Extract		
Sample	Absorbance	Reduction Rate(%)
Normal ¹⁾	0.268±0.022	-
LPS ²⁾	0.645±0.018	-
OSKM ³⁾	50µg/ml	0.340±0.006*
	5µg/ml	0.559±0.012*

1) Non-treated group
 2) LPS(1µg/ml) treated group
 3) LPS + OSKM treated group
 * Statistically significant compared with LPS treated group(*: p<0.05)

1,500ml(1:10 weight/volume)를 가하여 5일간 냉침 추출한 다음, Whatman filter paper No.4를 사용해 고품분을 제거하고 rotary evaporator를 이용해 감압농축시켜 얻었다. 투약할 때에는 농축시킨 烏藥順氣散加味方 추출액을 70% ethanol을 이용해 필요한 농도로 희석한 다음 실험에 사용하였다.

4. 炎症反應에 對한 測定

1) NO 生成 抑制力 測定

RAW 264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS법^{13,14)}으로 NO 생성 억제력 평가를 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1×10⁶cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 실험군은 배지를 제거하고 인산염 완충 용액으로 2회 세척한 후, phenol red가 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 烏藥順氣散加味方 추출액을 50µg/

Table 3. Inhibitory Effects of OSKM on Pro-Inflammatory Cytokines mRNA Expression in RAW 264.7 Cell

Sample	Density of mRNA Expression(µg/ml)		
	IL-1β	IL-6	TNF-α
Normal ¹⁾	0	0	18
LPS ²⁾	94	46	86
OSKM ³⁾	50 µg/ml	75(20%)*	48(-4%) 58(41%)
	5 µg/ml	102(-8%)	57(-23%) 75(16%)

1) Non-treated group
 2) LPS (1µg/ml) treated group
 3) LPS + OSKM treated group
 * Inhibition rate = 1 - (DensityNormal-DensityOSKM)/(DensityLPS-DensityOSKM)

Table 3. Inhibitory Effects of OSKM on Pro-Inflammatory Cytokines mRNA Expression in RAW 264.7 Cell

Sample	Density of mRNA Expression($\mu\text{g/ml}$)		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Normal ¹⁾	0	0	18
LPS ²⁾	94	46	86
OSKM ³⁾	50 $\mu\text{g/ml}$	75(20%)*	48(-4%) 58(41%)
	5 $\mu\text{g/ml}$	102(-8%)	57(-23%) 75(16%)

1) Non-treated group

2) LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) treated group

3) LPS + OSKM treated group

* Inhibition rate = 1 - (DensityNormal-DensityOSKM)/(DensityLPS-DensityOSKM)

ml과 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가해 1시간 동안 처리하였다. 이때 대조군은 추출물을 첨가하지 않은 배지만을 가하였다. 그리고 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 상층액을 100 μl 씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS 시약을 100 μl 씩 가해 상온에서 5분간 반응시킨 다음, 정상군, 대조군 그리고 실험군 모두 ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2) Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 遺傳子 發顯 抑制力 測定 (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

Monolayer를 형성한 RAW 264.7 세포를 scrapper를 이용해 떼어내고, 1 $\times 10^5$ cells/ml의 농도로 희석시킨 후 60mm dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포 배양액을 교체하고, 70% ethanol로 희석한 烏藥順氣散加味方 추출액을 dish당 10 μl 씩 가하여 3시간동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 70% ethanol을 사용하였다.

3) COX-2 活性 抑制力 測定

ICR mouse의 복강에 차가운 phosphate buffered saline (PBS) 5ml를 가하고 약 2분간 마사지 한 후 주사기를 이용해 대식세포가 들어있는 복강액을 회수하였다. 복강액을 2회 세척한 후 RPMI 1640 배지로 106 cell/ml의 농도로 현탁시킨 후 aspirin을 최종농도가 500 μM 이 되도록 첨가하여 세포 내에 잔존하고

있는 COX-2를 억제시켰다. 희석액을 96 well plate에 105 cell/well의 농도로 seeding한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2 incubator에서 3시간 배양하여 부착시킨 후 배양액을 제거하고, PBS로 2회 세척한 후, 3% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 well당 200 μl 씩 첨가하였다. LPS와 烏藥順氣散加味方 추출액을 well당 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2 incubator에서 8시간 배양한 후, 상층액을 취해 Prostaglandin E2 ELISA Kit를 이용해 Prostaglandin E2를 정량하였다¹³⁾.

5. Collagen 誘發 關節炎 發生 抑制力 測定

1) 形態計測學的 檢査

① 足浮腫의 測定

실험개시일, 10일, 15일 및 20일에 모든 개체의 좌우 후지의 족부종을 plethysmometer로 측정하고, 좌우의 평균값을 구하였다.

② 足跟關節幅의 測定

실험개시일, 10일, 15일 및 20일에 모든 개체의 좌우 후지의 족근관절의 폭을 digital caliper로 측정하고

Table 4. Inhibitory Effects of COX-2 by OSKM Extract

Sample	PGE2 ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition of PGE2 release(%)
Normal ¹⁾	86	-
LPS ²⁾	125	-
OSKM ³⁾	108	44

1) Non-treated group

2) LPS treated group

3) OSKM extract treated group(10 $\mu\text{g/ml}$)

Table 5. Effect of OSKM on the Paw Edema Volume in Rats induced by Collagen

Group	No. of Animals	Paw Edema Volume (ml)			
		Day 0	Day 10	Day 15	Day 20
Normal ¹⁾	8	1.69±0.026 ^{a)}	1.74±0.034	1.77±0.035	1.81±0.021
Control ²⁾	8	1.69±0.020	1.76±0.025	1.82±0.022*	2.24±0.402*
OSKM ³⁾	8	1.69±0.020	1.75±0.043	1.78±0.09	2.05±0.322#

1) Non-treated group

2) Water(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

3) OSKM(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

a) Mean ± SD

* Statistically significant compared with normal group (*: p<0.05)

Statistically significant compared with control group (#: p<0.05)

Table 6. Effect of OSKM on the Thickness of Ankle Joint in Rats induced by Collagen

Group	No. of Animals	Thickness of Ankle Joint (ml)			
		Day 0	Day 10	Day 15	Day 20
Normal ¹⁾	8	5.64±0.085a)	5.68±0.087	5.68±0.053	5.69±0.072
Control ²⁾	8	5.65±0.068	5.77±0.166	5.99±0.126*	7.47±1.339*
OSKM ³⁾	8	5.65±0.072	5.75±0.149	5.87±0.213	6.79±1.219*,#

1) Non-treated group

2) Water(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

3) OSKM(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

a) Mean ± SD

* Statistically significant compared with normal group (*: p<0.05)

Statistically significant compared with control group (**: p<0.05)

고 좌우의 평균값을 구하였다.

2) 血中 TNF-α 含量 測定

실험개시 20일에 모든 개체를 대상으로 심장 채혈하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 혈청 중 TNF-α 함량은 ELISA kit를 이용해 측정하였다. 표준액의 흡광도를 이용해 회귀방정식을 구한 후, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용해 TNF-α 의 농도를 구하였다.

6. Collagen 誘發 關節炎 治療 效果 測定

1) 形態計測學的 檢査

① 足浮腫의 測定

실험개시일, 5일, 10일 및 15일째에 모든 개체의 좌우 후지의 족부종을 plethysmometer를 이용해 측정하고, 좌우 평균값을 구하였다.

② 足跟關節幅의 測定

실험개시일, 5일, 10일 및 15일째에 모든 개체의 좌우 후지의 족근관절의 폭을 digital caliper를 이용해 측정하고 좌우의 평균값을 구하였다.

2) 血中 TNF-α 含量 測定

실험개시 15일 후에 심장 채혈하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 혈청중 TNF-α 함량을 ELISA kit를 이용해 측정하였다.

4) 統計處理

Collagen 유발 관절염의 발생억제와 치료에 대한 실험의 결과는 SPSS for Windows ver. 10.0, U.S.A.를 이용하여 student's t-test를 실시하여 통계적 검증을 하였다.

結果

1. 炎症反應에 미치는 影響

1) NO 生成 抑制力

RAW 264.7 세포를 이용해 GRIESS 법으로 烏藥順氣散加味方의 NO 생성억제력을 평가한 결과, NO 생성은 50 μ g/ml과 5 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 80.8%와 22.8%로 유의성 있게 억제되었다

2) IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 遺傳子 發顯 抑制力 (RT-PCR)

烏藥順氣散加味方이 RAW 264.7 세포에서 LPS의 자극을 받아 생성하는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과는 다음과 같다.

① IL-1 β 遺傳子 發顯에 미치는 影響

LPS 처치군의 density는 94 μ g/ml였으며, 실험군의 경우 50, 5 μ g/ml의 농도에서 각각 75 μ g/ml, 102 μ g/ml로 IL-1 β 의 유전자 발현을 억제시켰다(Table 3).

② IL-6 遺傳子 發顯에 미치는 影響

실험군은 IL-6유전자 발현에 영향을 미치지 못하였다(Table 3).

③ TNF- α 遺傳子 發顯에 미치는 影響

TNF- α 유전자의 발현은 정상군의 경우 18 μ g/ml, LPS 대조군의 density는 86 μ g/ml이었으며, 실험군의 경우 50, 5 μ g/ml의 농도에서 각각 58 μ g/ml, 75 μ g/ml로 농도 의존적으로 TNF- α 의 유전자 발현을 억제시켰다(Table 3).

3) Cyclooxygenase 2(COX-2) 活性 抑制力

실험군 추출액이 COX-2의 활성억제에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용해 평가한 결과, 실험군 추출액은 10 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해, COX-2의 활성을 44% 억제시켰다(Table 4).

2. Collagen 誘發 關節炎 發生抑制에 미치는 影響

1) 足浮腫의 變化

실험 10일까지는 모든 실험군 간에 의미 있는 차이가 없었고, 대조군의 족부종은 실험개시 15일 후에는 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 실험군의 족부종은 실험개시 20일 후 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 5).

2) 足跟關節幅의 變化

실험 10일까지는 모든 실험군 간에 뚜렷한 차이가 없었으나, 실험 20일에 실험군의 족근관절 폭은 유의성 있게 감소하였다(Table 6).

3) 血中 TNF- α 含量的 變化

혈중 TNF- α 함량은 대조군과 실험군에서 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 실험군의 TNF- α 함량은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 7).

3. Collagen 誘發 關節炎 治療效果에 미치는 影響

1) 足浮腫의 變化

실험군의 족부종은 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 8).

2) 足跟關節幅의 變化

실험군의 족근관절 폭은 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다(Table 9).

3) 血中 TNF- α 含量的 變化

실험군의 혈중 TNF- α 함량은 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 10).

고 찰

痺란 閉, 즉 막혀서 잘 통하지 않는다는 뜻으로, 《醫學入門》¹⁴⁾에서는 ‘痺者 氣閉塞不通流也 或 痛痺 或 手足緩弱 與 痿 相類’라 하였다.

痺證에 대하여 가장 먼저 언급된 곳은 《黃帝內經》¹⁵⁾인데, <靈樞·壽夭剛柔論>에서 ‘病在陰者名曰痺’라 하고 <素問·宣明五氣論>에서 ‘五邪所亂 邪入於陰則痺’라 하여痺는 병이陰에 있는 것이라 하였고, <素問·痺論>에서 ‘風寒濕三氣雜至, 合而爲痺’인데 ‘所謂痺者 各以其時 重感於風寒濕之氣也’라 하고 <素問·五臟生成篇>에서 ‘臥出而風吹之 血凝於膚者爲痺’라 하여, 風寒濕이痺의 원인이라 하였으며, <素問·金匱眞言論>에서 ‘冬善病痺厥 故冬不按蹻’라 하여 겨울에 잘 발생한다 하였고, <靈樞·五變篇>에서 ‘粗理而肉不堅者善病痺’라 하여

발병하기 쉬운 체질을 말하였으며, <素問·診要經終論>에서 '冬刺夏分病不愈 氣上發爲諸痺' 라 하여 誤治하여 오래 지나면 痺가 된다 하였다.

痺證은 '輕則骨節疼痛 走注四肢 難以轉移 肢節或紅或腫 甚則 遍體癩塊 或腫如匏 或痛如掣 晝靜夜劇 以其痛循歷節'¹⁵⁾라 하여 關節과 全身의 痛症을 主症狀으로 하는데, 이상에서 본 바와 같이 痺證의 病因病理와 臨床 症狀은 서양의학에서 말하는 류마티드 관절염, 통풍, 퇴행성관절염, 폐색성혈전혈관염, 경피증, 전신성 홍반성낭창, 근염 등의 증상과 유사한 것으로 볼 수 있다¹⁾.

류마티드 관절염은 활막의 만성적 비대와 염증성 반응을 초래하여 활막의 증식, 단핵구 세포의 침윤, 신생 혈관형성 등의 병적 현상들이 상호작용하여 활막 조직의 항상성이 파괴되는 원인불명의 만성 전신성 염증성질환이다. 류마티드 관절염의 특징은 관절통과 종창이 악화과 호전을 반복하는 만성 전신성 결체조직 질환으로 발병 초기에는 수지부의 早朝강직및 대칭적인 다발성 관절염을 나타내는데, 手指部 이외에도 足趾, 腕, 踝 등의 소관절에 특히 호발되며 견관절, 슬관절은 빈도가 낮거나 늦게 발생한다. 초기에는 관절의 紅, 腫, 熱, 痛과 운동장애를 초래하고, 질병이 진행됨에 따라 관절의 강직이나 기형, 운동제한, 골격의 위축 등이 속발된다¹⁶⁾.

류마티드 관절염에는 비스테로이드성 항염증약물, Corticosteroids 류 항류마티드약물, 생물학적약물 등 다양한 약제들이 사용되고 있으나, 치료의 목표는 염증, 통증을 감소시키고 기능을 보존하며 변형을 예방하는 것이다¹⁶⁾.

痺症의 치료원칙은 寒者는 溫之하고 熱者는 清之하며 濕痰癥 등의 有形之邪가 있으면 去之하고 虛者는 補之하는데, 痺症의 주요한 임상증상은 痛症이며, 병리적으로 氣血不通하여 나타나는 것이므로 각종 痺證의 공통적인 처방은 宣通이며, 氣血과 榮衛가 순행하면 痺痛은 자연스럽게 소실된다¹⁾ 하였다.

본 연구에 사용된 烏藥順氣散은 宋代《太平惠民

和劑局方》¹⁶⁾에 처음으로 수록된 처방으로, 一切風氣가 攻注四肢하여 骨節疼痛하거나 遍身頑麻하는 경우에 활용되는데, 저자는 李¹⁵⁾의 醫案에 '遍體疼痛 尻體皆腫 足膝攣急에 烏藥順氣散을 써서 완치하였다'는 기록과, 烏藥順氣散이 行氣止痛하는 작용으로 歷節風과 風寒痺를 다스리는 처방¹⁷⁾으로 관절염에 임상적으로 효과가 있음^{7,10)}에 착안하여, 烏藥順氣散의 관절염 및 류마티드 관절염의 예방과 치료에 미치는 영향을 실험적으로 규명해보고자 하였다.

烏藥順氣散의 구성을 살펴보면 麻黃과 桔梗은 肺家의 藥으로 發汗하여 祛寒하고, 川芎과 白芷는 頭面의 藥으로 散風하여 活血하며, 枳殼과 陳皮는 利氣行痰하고, 白僵蠶은 清化散結하고, 乾薑은 溫經通陽하고, 甘草는 和中瀉火하고, 烏藥은 邪氣가 凝滯한 것에, 諸氣를 通行하게 하여 먼저 表氣를 解하고 裏氣를 順하게 하므로 氣가 순행한즉 散風하게 되는데¹⁷⁾ 본 실험에서는 烏藥順氣散에 燥濕化痰 消痞散結하는 半夏, 祛風濕 利關節하는 羌活, 祛風除濕 解表止痛하는 獨活, 舒筋活絡 和胃化濕하는 木瓜, 行水 利濕熱하는 赤茯苓, 發汗解肌 溫經通絡하는 桂枝¹⁸⁾를 加味하였고, 藥量 또한 모두 8g으로 균등하게 하여 烏藥順氣散加味方을 만들어 실험에 활용하였다.

본 연구의 실험에서는 烏藥順氣散加味方이 collagen 유발 관절염을 비롯한 일반적인 염증 반응에 미치는 영향을 체계적으로 규명코자, 염증과 직접적으로 관련된 주요 생체반응에 미치는 烏藥順氣散加味方 추출액의 효과를 검증하였다.

NO는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 烏藥順氣散加味方 추출물이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는지의 여부를 평가하기 위해, 염증실험에 널리 활용되고 있는 macrophage 세포주인 RAW264.7¹⁹⁾를 이용한 실험을 실시하였으며, 그 결과 烏藥順氣散加味方 추출물은

Table 8. Effect of OSKM on the Paw Edema Volume of Collagen-induced Rats

Group	No. of Animals	Paw Edema Volume (ml)			
		Day 0	Day 5	Day 10	Day 15
Normal ¹⁾	5	1.86 ± 0.044 ^{a)}	1.80 ± 0.036	1.81 ± 0.030	1.80 ± 0.022
Control ²⁾	5	2.84 ± 0.457*	2.68 ± 0.345*	2.59 ± 0.270*	2.52 ± 0.274*
OSKM ³⁾	5	2.82 ± 0.411*	2.63 ± 0.275*	2.60 ± 0.249*	2.47 ± 0.233*

1) Non-treated group

2) Water(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

3) OSKM(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

a) Mean ± SD

* Statistically significant compared with normal group (*: p<0.05)

Table 9. Effect of OSKM on the Thickness of Ankle Joint of Collagen-induced Rats

Group	No. of Animals	Thickness of Ankle Joint (mm)			
		Day 0	Day 5	Day 10	Day 15
Normal ¹⁾	5	5.81 ± 0.137 ^{a)}	5.81 ± 0.115	5.83 ± 0.096	5.81 ± 0.072
Control ²⁾	5	8.61 ± 1.427	8.61 ± 1.161	8.35 ± 0.871	8.12 ± 0.883
OSKM ³⁾	5	8.86 ± 1.350	8.50 ± 0.926	8.31 ± 0.813	7.98 ± 0.801

1) Non-treated group

2) Water(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

3) OSKM(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

a) Mean ± SD

* Statistically significant compared with normal group (*: p<0.05)

50µg/ml와 5µg/ml의 농도에서 각각 80.8%와 22.8% 억제시켜 우수한 NO 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다. 이 결과는 烏藥順氣散加味方이 염증 치료 및 억제를 위한 처방에 NO 형성억제 물질로 활용될 수 있음을 의미하는 것으로 사료된다(Table 2).

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1β, IL-6 및 TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 관절염의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 NO생성 억제력을 가진 것으로 평가된 烏藥順氣散加味方이 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가하였으며, 그 결과 烏藥順氣散加味方 추출물은 TNF-α의 유전자 발현을 억제시키는 작용을 해 烏藥順氣散加味方은 관절염의 발생억제 및 치료에 유용하게 사용될 수

있음을 확인하였다(Table 3).

Prostaglandin(PG)은 세균의 감염에서 유래한 LPS, 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 COX 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다²⁰⁾. 따라서 항염증제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다²¹⁾. 이에 본 연구에서도 烏藥順氣散加味方 추출물이 COX II 효소의

Table 10. Effects of OSKM on the TNF- α Level on Collagen Immunized Rats at 15 Days After 1st Collagen Immunization.

Group	No. of animals	TNF- α level (pg/ml)
Normal ¹⁾	5	19.5 \pm 2.29 ^{a)}
Control ²⁾	5	56.4 \pm 26.18
OSKM ³⁾	5	52.6 \pm 14.06

1) Non-treated group

2) Water(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

3) OSKM(1ml/rat) was given to treatment group after this was immunized by collagen

a) Mean \pm SD

활성을 억제시키는 지의 여부를 ELISA kit를 이용해 평가하였으며, 그 결과 烏藥順氣散加味方 추출물은 10 μ g/ml에서 COX II 효소의 활성을 44% 억제시키는 것으로 평가되어, 烏藥順氣散加味方은 강력하지는 않지만 COX II 억제를 통한 항염소재로도 사용될 수 있음을 확인하였다(Table 4).

관절염의 예방과 치료제 개발과 관련된 대부분의 연구 중 류마티오이드성 관절염에는 type II collagen 유발 관절염 모델이 주로 이용되고 있다²³⁾. 1977년 Trentham 등에 의해 실험동물에 type II collagen을 접종하여 류마티오이드 관절염과 유사한 염증성 관절염이 유발된다고 보고되었고²³⁾, 실제 류마티오이드 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되고, 질병의 진행에도 관련된다고 보고되는 등, 이 모델이 면역학적, 조직학적, 임상적으로 사람의 류마티오이드성 관절염과 매우 유사함이 확인되어 류마티오이드성 관절염과 관련된 연구의 실험모델로 널리 이용되고 있다²⁴⁾.

국내의 한의학계에서도 type II collagen 유발 관절염에 대한 연구가 계속적으로 진행되어 大羌活湯²⁵⁾, 骨痰草²⁶⁾, 冬蟲夏草²⁷⁾ 등의 처방이 관절염에 미치는 영향에 관한 연구가 진행된 바 있다.

그러나 일부 연구를 제외한 상기한 거의 모든 실험은 collagen에 의해 관절염이 유발된 이후의 치료 효과를 연구한 것으로, 투여된 약물이 관절염 발생과 어떠한 관련이 있는 지에 대한 사실 규명은 미미한 실정으로, 본 연구에서는 烏藥順氣散加味方이 관절염 및 collagen으로 유발된 관절염의 치료에 미치는 영향을 평가할 뿐 아니라, collagen 접종 때부터 실험동물에게 실험약물을 투여하며 관절염 발생

제에 미치는 영향에 대해서도 같이 살펴보았다.

관절염 발생 실험에서의 육안적 소견을 종합하면, 족부종의 경우에 실험개시 15일 후부터 대조군보다 감소하는 경향을 보이기 시작하여, 20일 후에는 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 관찰되어, 烏藥順氣散加味方은 형태계측학적 소견상 관절염 발생억제효과가 우수한 것으로 확인되었다(Table 5,6). 그러나 관절염 치료효과 실험에서는 족부종과 족근관절 폭의 감소가 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으나, 유의성 있는 감소를 보이지는 못해, 烏藥順氣散加味方은 형태계측학적 소견상 관절염 치료효과는 미약한 수준인 것으로 사료되었다(Table 8,9). 이것은 烏藥順氣散加味方이 消風하는 효과로 인해 예방효과는 있지만, 이미 濕熱이 끼어 든 염증상태는 개선시키지 못하는 것으로 해석되어진다.

류마티오이드 관절염의 특징 중 하나는 관절내의 활막에서 일어나는 T cell의 침윤이다²⁸⁾. T cell이 항원과 결합하면 증식이 일어나고, TNF- α 와 IL-1, IL-6과 같은 cytokine들을 방출해 B cell을 활성화시켜 자가항체로 rheumatoid factor를 생성시키고, 이 rheumatoid factor는 IgG와 결합해 면역복합체를 형성하며, 이 면역복합체는 보체를 활성화해 화학주성인자들을 방출시키면, 중성구가 반응하여 collagenase와 같은 효소가 활액세포 파괴 및 염증반응을 일으키는 것으로 보고되고 있다²⁹⁾.

TNF- α 는 활성화된 대식세포와 단핵구에서 분비되는 염증 매개물질의 하나로 미생물에서 분비되는 LPS 등에 의해 분비가 증가되며, IL-1과 함께 활막의 섬유아세포와 연골세포에서 교원세포 분해효소와

단백 분해효소의 분비를 촉진시키며, 관절연골 표면의 proteoglycan 형성을 억제하고, 교원세포의 분해를 야기해 결국 관절연골의 파괴를 유도하는데 주된 역할을 한다^{30,32}). 실제로 류마티드 관절염 환자의 혈액에서는 TNF- α 가 일반인보다 많이 검출되는 것으로 보고되기도 하였다^{33,34}). IL-6는 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되며, 관절염환자의 혈청과 관절염으로 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가한다³⁵⁻³⁷). 특히 IL-6는 관절조직의 혈관 등에서 분비되어 혈청에서보다 관절액에서 더 높은 활성을 보이는 것으로 보고하는 등 IL-6는 류마티드 관절염에서 중요한 역할을 담당하고 있다^{37,38}).

본 연구에서도 형태계측학적 소견상 관절염의 발생 억제효과가 우수한 것으로 확인된 실험군의 TNF- α 함량이 대조군보다 유의성 있게 감소되어 (Table 7), 형태학적 소견뿐 아니라 혈액학적 소견에서도 관절염 발생 억제효과가 있는 것을 확인하였다. 그러나 형태계측학적 소견상 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보이지 못한 치료효과 실험에서의 TNF- α 함량은, 역시 대조군에 비해서는 약간 감소하였으나 통계적인 유의차는 없는 것으로 확인되어 혈액학적 평가에서도 미미한 치료효과를 보이는 것으로 사료되었다(Table 10). 혈중 TNF- α 가 류마티드 관절염의 발생에 중요한 역할을 한다는 점을 고려한다면 형태학적으로 관찰된 烏藥順氣散加味方의 관절염 발생 억제효과는 혈중 TNF- α 의 감소에서 기인된 결과인 것으로 사료된다.

이상의 연구결과에서 烏藥順氣散加味方은 collagen으로 유발되는 관절염의 발생억제에 우수한 효과를 보였으나, 치료효과에 대해서는 미미한 수준인 것으로 평가되었다. 그러나 烏藥順氣散加味方은 우수한 NO 생성억제력과 염증관련 cytokine 유전자의 발현 억제력을 비롯해 COX II 활성억제, 모세혈관 투과성억제 및 백혈구 유주억제 등에 효과를 보인 점을 고려할 때 관절염을 비롯한 여러 염증질환의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 사료되며, 빠르게 노년층이 증가하고 있는 우리나라의 보건건강에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

결론

烏藥順氣散加味方이 염증반응에 미치는 영향을 알아보고자 nitric oxide 생성억제력과 염증관련 cytokine 발현억제력 등을 평가하였고, collagen 유발 관절염의 발생억제와 치료에 미치는 영향을 알아보고자 족부중, 족근관절의 폭 등 형태계측학적 소견과 혈청학적 소견을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 炎症反應에 미치는 影響

NO 생성과 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 유전자의 발현은 농도 의존적으로 억제되었고, COX-2의 활성은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 44% 억제되었다.

2. Collagen 誘發 關節炎 發生抑制에 미치는 影響

족부중, 족근관절의 폭 및 혈중 TNF- α 함량은 각각 유의성 있게 감소하였다.

3. Collagen 誘發 關節炎 治療에 미치는 影響

족부중, 족근관절의 폭 및 혈중 TNF- α 함량은 뚜렷한 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아 烏藥順氣散加味方은 관절염을 비롯한 여러 염증질환의 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 사료되며, 향후 임상에서의 활용이 기대된다.

참고문헌

1. 韓方再活醫學科學會. 韓方再活醫學科學. 서울:군자출판사. 2003:78-79,90-91,91-92.
2. 洪元植. 黃帝內經. 서울:고문사. 1974:15,35,45,71,114,165,296,339.
3. 金起瑩. 類風濕性關節炎의 病因, 病機 및 治法에 對한 文獻의 考察. 韓方再活醫學科學會誌. 1998;8(2):223-242.
4. 上海中醫學院. 中醫內科學, 商務印書館. 1977:200-203.
5. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 서울:법민출판사. 2002:973.
6. 太醫局. 太平惠民和劑局方. 上海,校經山房.

- 1925:53.
7. 賈兆璋. 自製消痺酊與投類風濕膠囊合用治療類風濕性關節炎65例. 中醫臨床雜誌. 1999;11(4):218-219.
 8. 邱志濟. 自擬五生煎合南星辛附湯治療類風濕關節變形30例. 遼寧中醫雜誌. 1999;26(5):221.
 9. 洪桂敏. 蠲痺 I II 治療類風濕性關節炎100例. 遼寧中醫雜誌. 1999;26(3):18.
 10. 沈曉燕. 類風濕性關節炎中醫研究的策略. 中醫臨床雜誌. 1999;11(4):216-218.
 11. 李城任. 烏藥順氣散的消炎鎮痛作用에 관한研究. 朝鮮大學校大學院. 1993.
 12. 李揆相. 烏藥順氣散煎湯液이 H₂O₂에 의해損傷된培養脊髓感覺神經細胞에 미치는影響. 圓光大學校大學院. 1999.
 13. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42:558-566.
 14. 李旻. 醫學入門. 天津. 天津科學技術出版社. 1999:825-828.
 15. 李中梓. 醫宗必讀. 서울:목과토. 2000:918.
 16. 강병철. 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리. 2000:876-878,892-899.
 17. 王 昶. 國譯 醫方集解. 서울:大星文化社. 1984:241-243.
 18. 黃宮繡. 本草求真. 서울:목과토. 1999:192, 227, 229, 250, 343, 423.
 19. 김류규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태. 녘치 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과, 약학회지, 2002:343-347.
 20. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. 분자세포생물학뉴스. 2001;13:8-17.
 21. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42:558-566.
 22. Brackertz D, Mitchell GF and Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. Arthritis Rheum. 1997;20:842-850.
 23. Trentham DE et al. Autoimmunity to type II collagen. an experimental model of arthritis. J Exp Med, 1977;146:857-968.
 24. 박경아, 이원택, 박미경, 이종은. 조직학. 고려의학. 1992:127.
 25. 이호근, 정석희, 김성수. 대강활탕이 제2형 collagen 유발關節炎의 항체에 미치는 영향. 한방물리요법과학회지. 1994;4:87-99.
 26. 엄재원, 정석희, 이종수, 김성수, 신현대. 골담초가 제2형 collagen 유발關節炎의 항체에 미치는 영향. 한방물리요법과학회지. 1995;5:149-161.
 27. 서영배. 동충하초가 synovial 세포증식과 collagen에 의해 유발된 생쥐의關節炎 억제에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 한의학과. 2000.
 28. Postigo AA, Garcia-Vicuna R, Gonzalez R, Arroyo AG. Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. J Clin Invest. 1992;89:1445-1452.
 29. 김창중, 서병세. 최신 병태생리학. 신일서적. 2000:449.
 30. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis - Pathology and implication for therapy. New Engl. J. Med. 1990;322:1277-1289.
 31. Arend WP and Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors of antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1990;33:305-315.
 32. Henderson B and Pettipher ER. Arthritogenic

- actions IL-1 and TNF- α in rabbit evidence for synergistic interaction between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol.* 1989;75:306-310.
33. Saxne T, Palladino MA, heinegard D, Talal N, Wollheim F. Detection of TNF- α but not TNF- β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* 1988;31:1041-1045.
34. Giovine FS, Nuki G, Duff GW. TNF in synovial exudates. *Ann Rheum Dis.* 1988;15:1463-1470.
35. Okumoto H, Matsuda T and Turner M. The synovial expression and serum level of IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor and oncostatin in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 1997;40:1096-1105.
36. Waage A, Kaufmann C, Espevik T, Husby G. IL-6 in synovial fluid patient with arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989;50:394-398.
37. Frederic A and Houssian J. IL-6 synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 1988;31:783-788.
38. Katherine L, Manson TL and Moore JM. Cytokine level in synovial fluid and serum. *J Immunol Methods.* 1994;138:47-56.