

CYTG 처방이 콜라겐 유발 관절염 모델에 미치는 효과

최성욱 · 김용찬 · 김경신 · 김병수 · 임종순¹ · 강정수*

대전대학교 한의과대학 생리학교실, 1:대전대학교 동서생명과학연구소

Suppressive Effect of CYTG on Collagen Induced Arthritis(CIA) in DBA1/J Mice

Sung Wook Choi, Yong Chan Kim, Kyoung Shin Kim, Byoung Soo Kim, Jong Soon Lim¹, Jung Soo Kang*

Department of Physiology of Oriental Medicine, Daejeon University, 1: Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

To evaluate effect of CYTG on inhibiting the occurrence of arthritis, we performed the experiments including production of inflammatory cytokine and immunoglobulin in collagen arthritis model. The results were obtained as follows. CYTG group showed inhibitory effect on arthritis incidence than control group for four weeks. Arthritis index of CYTG group reduced compared with control group. In CYTG group, production of cytokines which show suppressive effect on inflammation(IL-2, COX-2) was increased and which promotes inflammation(IL-10) was decreases in spleen. In CYTG group, production of immunoglobulin (IgG-RF) was reduced compared with control, and rate of CD3+CD69+ T cell is lower in lymph node and CD4+CD25+ T cell is higher in lymph node and spleen. And synovial infiltration in the knee were observed in the controls (PBS-treated mice), whereas CYTG-treated mice exhibited significantly reduced histologic evidence of destruction and inflammation. So, the histopathological scoring average of CYTG group was 2.5 compared with control group(CIA mice) 4.5. It was thought that our data express high effect via immune system specially through the controlling the inflammatory cytokines and immunoglobulins. CYTG could be usefully applied for the prevention and treatment of RA, and also is expected to be clinically helpful on the treatment of RA through modification.

Key words : arthritis CYTG, inflammatory cytokines, immunoglobulins

서 론

관절염은 병명이 아닌 관절을 침범하는 모든 염증을 일컫는 일반적 용어로, 관절의 동작제한, 강직, 염증, 통증, 부종 등을 유발하는 질환의 총칭인데¹⁾ 그 중 퇴행성 골관절염과 류마티스 관절염이 다발하는 대표적인 질환이다. 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 주로 가동관절(diarthrodial joint)에 대칭적으로 나타나는 전신성 만성 염증 질환이자 자가 면역 질환으로, 관절 강내 활막의 염증으로 연골 및 뼈에 지속적인 파괴가 일어나 통증, 부종, 관절 변형 등을 수반한다. 일반적으로, 이 질환에 민감한 유전적 성향을 가진 사람이 RA 병인에 관련된 항원에 노출되어 자가 관용(self tolerance) 파괴부터 관절 부전의 임상적 소견에 이르기까지 다양한 면역계의 dysregulation이 나

타나는 것으로 알려져 있다.

한의학에서 관절염은 크게는 痺證, 작게는 脚氣, 歷節風 등에 해당한다²⁾. 과로, 정신적 손상, 濕氣가 많은 곳에서의 생활, 잘못된 식생활 등의 상황에서 風·寒·濕의 邪氣가 피부를 침입하여 발병하는 것으로, 통처가 움직이는 行痺, 통증이 심한 痛痺, 거동이 힘들고 감각이 둔한 着痺, 그리고 歷節風, 脚氣 등으로 표현된다. 한의학에서는 RA를 국소적인 통증부위만의 이상이 아니라 全身의 氣血 순환장애로 인식하므로, 기존 관절염에 대한 연구 역시 풍습^{3,4)}, 어혈^{5,6)}, 보약⁷⁾, 약침·봉침·전침^{8,9)} 등의 관점에서 연구되었다.

면역이상에 의한 관절염의 치료물질을 찾기 위하여 오랜 역사를 통해 검증되어진 한약처방을 스크린 하던 중, 높은 유효성의 면역억제 효과가 있는 淸心蓮子湯을 찾았다. 침선연자탕은 『東醫壽世保元』에 기재된 처방으로 기존에 노화¹⁰⁾ 항산화¹¹⁾ 항알러지¹²⁾ 등의 효과에 대한 연구보고가 있었다. 이 처방을 이용하여 in vitro에서 염증성 cytokine인 IL-2 억제능에 대하여 약의 조성 변화를 주는 방법으로 세부연구를 하던 중, 그 변방인 CYTG 처방

* 교신저자 : 강정수, 대전시 동구 용문동 96-3 대전대학교 한의과대학

E-mail : omdkjs@dju.ac.kr, Tel : 042-280-2617

접수 : 2006/12/15 · 수정 : 2007/01/12 · 채택 : 2007/01/31

에 유의성 있는 효과가 나타나 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약물의 조성 및 조제

약리 성분의 추출을 위하여 1접 분량의 총량 77.5g에 증류수 5,000 ml를 첨가하여 2시간 동안 가열한 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 20 g의 분말을 얻었고, 이를 냉동고(-20℃)에서 보관하면서 동물 실험 시 생리 식염수에 용해하여 사용하였다.

Table 1. CYTG의 생약 조성

한약명(韓藥名)	생약명(生藥名)	重量(g)
외이인(薏苡仁)	<i>Coicis Semen</i>	20
산약(山藥)	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	10
연자육(蓮子肉)	<i>Nelumbinis Semen</i>	10
상지(桑枝)	<i>Mori Ramulus</i>	10
해동피(海桐皮)	<i>Erythrinae Cortex</i>	10
죽여(竹茹)	<i>Bambusae Caulis in Taeniam</i>	5
황금(黃芩)	<i>Scutellariae Radix</i>	5
오미자(五味子)	<i>Schizandrae Fructus</i>	5
감국(甘菊)	<i>Chrysanthemi Flos</i>	2.5
총량(總量)		77.5

2. 실험 동물 및 collagen II에 의한 관절염 유발

실험동물은 6주령의 DBA1/J를 선택하여, 5마리를 한 군으로 정상군, 정상 발병군(대조군), 처방 투여군으로 나누었다. 충분히 공급된 고형사료와 물을 자유 식이하였고, 1일 중 12시간동안은 200~300 Lux로 조명하였고, 12시간동안은 모든 빛을 차단하였다. conventional system으로 실온 22±2℃를 유지하여 1 주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Type II collagen을 0.1 M Acetic acid에 2 mg/μg의 농도로 용해시킨 것을 동량의 Freund's incomplet adjuvant와 혼합한 후, 3,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 상층에 있는 콜라겐을 취하였다. 정상 발병군과 처방 투여군 기저부(tail base)의 피하내에 콜라겐 5 mg을 접종하고, 1 주 후에 추가접종(booster injection)하여 관절염을 유발시켰다. 처방 투여군은 1일 1회 체중 100g 당 40mg의 약물을 경구 투여하였다.

3. NF-AT(Nuclear Factor of Activated T-cell) 억제 효과 측정

NF-AT에 대한 억제활성을 변형된 SEAP assay를 통하여 측정하였다. NF-AT dependent transcriptional reporter gene으로 pCMV/SEAP가 함유된 Jurkat Cell Line을 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 IMDM에서 배양하였다.

NF-AT 세포들은 1X10⁴ cells/well 농도로 하였고, T 세포의 자극을 위하여 PMA와 Ionomycin을 사용하였으며, 면역억제 효과를 나타내는 cyclosporin A를 양성 대조군으로 하였다. 각 시료는 농도별로 세포주와 함께 37℃에서 18시간 동안 5% CO₂ incubator에 배양하였다. 배양된 반응물을 원심분리하여 각각의 상등액 50 μl에 200 μl의 SEAP buffer와 기질을 첨가한 후 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 다음, Microplate reader로 405nm에

서의 흡광도를 측정하였다.

4. 관절염 지수(arthritis index)에 따른 관절염의 임상적 평가

콜라겐 접종 후 2회/주 간격으로 관절 주위 부종 및 발적 등의 임상적인 관절염 증후를 sugita 관절염 지수를 이용하여 평가하였다(0 : 병변부위 없음, 1 : 병변부위 부종, 2 : 병변부위 2개소 이상의 부종, 3 : 병변부위 3개소 이상의 부종 관찰, 4 : 병변의 관절 변형)¹³⁾.

5. 혈액 중 IgG(Rheumatoid Factor, RF) 측정

DBA1/J를 Ethyl ether로 마취시키고 채혈을 한 후, RF의 측정을 위해 1,000 배로 희석한 혈청을 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit로 검사하였다.

6. 비장 및 림프노드에서의 FACS 분석

DBA1/J 생쥐의 비장 및 림프 노드 조직에 대하여 FACS 분석법을 통하여 세포의 조성비 변화를 측정하였다. 적출 조직을 100 mesh로 세포분리하고 D-PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer(FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들을 ACK 용액에 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

4℃에서 면역 형광염색 (immuno- fluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, fluorescein isothiocyanate(FITC)-anti-mouse CD19 등을 넣고 반응시켰다. 반응 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 세포 CD3e, CD4, CD8, CD25, CD69, CD19 등의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD3+CD19+, CD4+CD8+, CD4+CD25+, CD3+CD69+, CD3+CD4-CD8- 세포 등의 비율(gated, %)을 산출하였다.

7. 유전자 발현 변화 측정 (Real-time PCR법)

액체질소에 담갔던 비장에 RNAzolB를 넣고 용해될 때까지 분쇄한 후, chloroform(CHCl₃)을 첨가하여 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 회수하여 2-propanol과 혼합하였다. 이를 80% EtOH로 수세하고 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수에 녹여 75℃의 heating block에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. 역전사(reverse transcription) 반응에서는 M-MLV RT kit를 사용하여 cDNA로 polymerase chain reaction(PCR)을 하였다. PCR은 iCycler (BIORAD, USA)를 사용하였고 cDNA를 주형으로 사용하였는데, 주형에 대한 primer는 L32, IL-10, IL-2, γ-IFN를 사용하였고, pre-denaturation; 95℃, 5 분, denaturation; 95℃, 30 초, annealing; 58℃, 30 초, elongation; 72℃, 30 초를 40 cycles한 뒤 post-elongation을 72℃에서 3 분 동안하는 조건으로 PCR을 수

행하였다. Real-time PCR에서 나온 그래프는 iCycler 분석 프로그램을 이용하여 각 유전자의 발현 정도를 정량화하였다.

Table 2. Mouse Oligonucleotide의 염기배열

L32	Product of length 198 Sense Primer: TGCAAGAGGCATCAGGAAACGTG Antisense Primer: GCCCTGAGTCTTCTCTGCACCT
interleukin 10	Product of length 208 Sense Primer: TGA CTGGCATGAGGATCAGCAGG Antisense Primer: GCTTGCCAACCAAGTAACCCCTTAA
interleukin 2	Product of length 209 Sense Primer: TCGCATCCTGTGTACATTGACACT Antisense Primer: GGTGAGCATCCTGGGAGTTCA
interferon gamma	Product of length 202 Sense Primer: GAACGCTACACACTGCATCTGGCT Antisense Primer: GCTCTGCAGGATTTTCATGTCACCA

8. 조직 병리학적 검사

Joosten의 조직 병리학적 등급 체계에 따라 활액막 병변, 염증 침윤 정도, 연골 파괴, 골재 형성으로 구분하여 평가하였고, Hematoxylin & Eosin stain 및 Masson Trichrome stain을 이용하여 scoring기준에 따라 조직 병리학적 검사를 실시하였다¹⁴⁾.

9. 통계 분석

실험 결과는 평균값 ± 표준편차로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하였으며, P<0.05 일 때를 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. CYTG 처방이 NF-AT(Nuclear Factor-AT)에 미치는 영향

NF-AT reporter assay를 통하여 CYTG 추출물이 세포의 핵 내에 존재하는 NF-AT의 결합 능력에 미치는 영향을 분석하였다. 추출물의 농도에 따라 NF-AT가 대조군 대비 66.1%까지 저하됨을 확인하였다(Fig. 1).

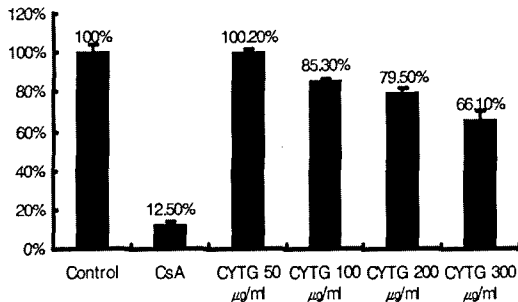


Fig. 1. Effect of CYTG on NF-AT inhibition in the NF-AT jurkat cell line in vitro. stimulated with PMA(10 ng/ml) and ionomycin(1 μM) and 50 or 100, 200, 300 μg/ml of CYTG was added. After 8 hr of cell incubation, SEAP expression levels of analyzed. Results are mean ± SD (n=5). *p < 0.05 versus control group. Control : PMA/ionomycin stimulation + PBS treatment. CsA : PMA/ionomycin stimulation + CsA treatment. CYTG 50 : PMA/ionomycin stimulation + 50 μg/ml of CYTG C treatment. CYTG 100 : PMA/ionomycin stimulation + 100 μg/ml of CYTG C treatment. CYTG 200 : PMA/ionomycin stimulation + 200 μg/ml of CYTG C treatment. CYTG 300 : PMA/ionomycin stimulation + 300 μg/ml of CYTG C treatment

2. CYTG 처방에 의한 유전자 발현 변화

Jurkat T-세포 자극원인 PMA/ionomycin으로 1시간동안 처

리한 후 Real-time RT-PCR 법으로 IL-2, COX2, IFN-γ, IL-10 등 다양한 유전자의 발현량을 확인하였다. 그 결과, IL-2, COX2, IFN-γ에서는 유의성 있게 감소하였으나, IL-10에서는 발현량에 유의한 변화가 없었다. 이를 통하여 편역 세포에서 Th1 cytokine 인 IFN-γ와 T-세포의 중요 cytokine인 IL-2, 대표적인 염증성 매개물질인 COX2의 억제능을 확인하였다(Fig. 2).

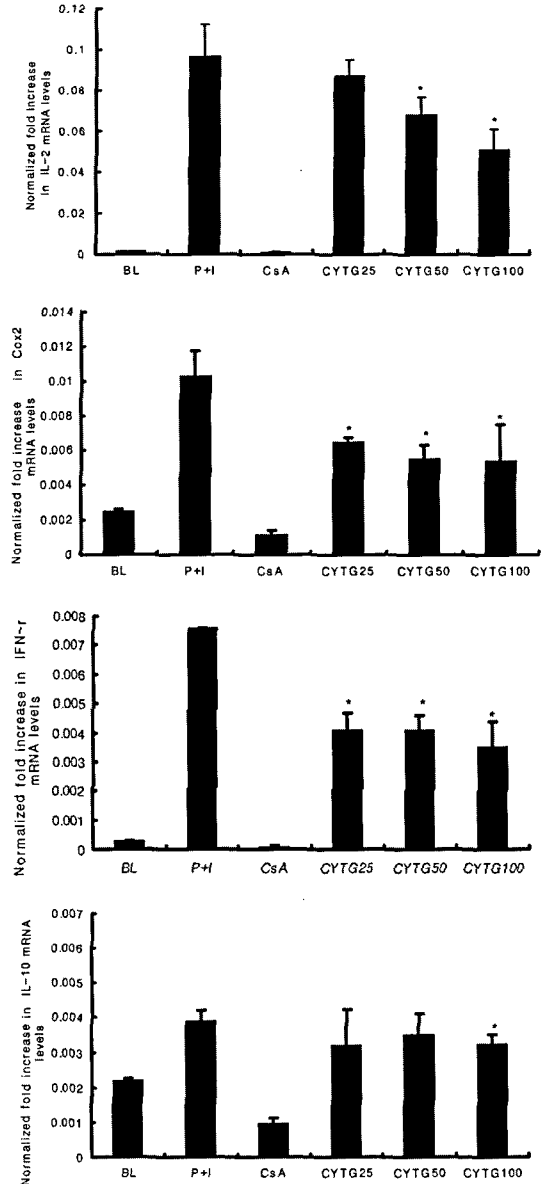


Fig. 2. Effect of CYTG on cytokine(IL-2, COX2, IFN-γ, IL-10) expression in the Splenocytes in vitro. stimulated with PMA(10 ng/ml) and ionomycin(1 μM) and 25 or 100 μg/ml of CYTG was added. After 1 hr of cell incubation, cells were harvested and gene expression levels of cytokine was analyzed by real-time RT-PCR method as described in Methods section. y axis means normalized fold increase in cytokine mRNA levels, that is gene expression levels of cytokine normalized against those of L32 gene. Results are mean ± SD. *p < 0.05 versus control group. BL : without PMA/ionomycin stimulation. P+I : PMA/ionomycin stimulation + PBS treatment. CsA : PMA/ionomycin stimulation + cyclosporin A. CYTG 25 : PMA/ionomycin stimulation + 25 μg/ml of CYTG treatment. CYTG 50 : PMA/ionomycin stimulation + 50 μg/ml of CYTG treatment. CYTG 100 : PMA/ionomycin stimulation + 100 μg/ml of CYTG treatment

3. CYTG 처방이 Arthritis index에 미치는 영향

CYTG 처방이 Arthritis index에 미치는 영향은 대조군의

경우 0 day에 4.66에서 시작하여 14 day에 6.83으로 최고에 달하고 28 day에는 6.6을 기록한 것에 반하여, 처방 투여군의 경우 0 day에는 5.16에서 시작하여 10 day에 6.3을 정점으로 28 day에는 4.5로 10일 이후 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 3, 4). 또한, 약물의 안정성 검사를 위하여 매주 실시한 각 군의 증체량 측정 결과, 유의한 체중 변화는 없었다(data not shown).

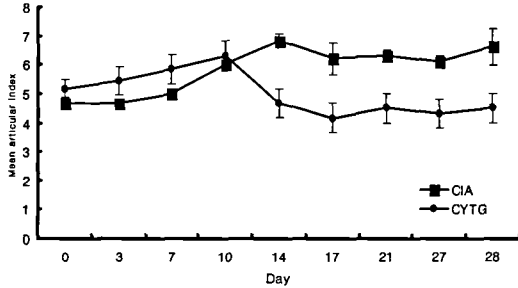


Fig. 3. Effect of CYTG on arthritis index in collagen-induced arthritis DBA1J mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Arthritis index was determined as described in Material and methods. Each column represents the mean from n=10 mice.

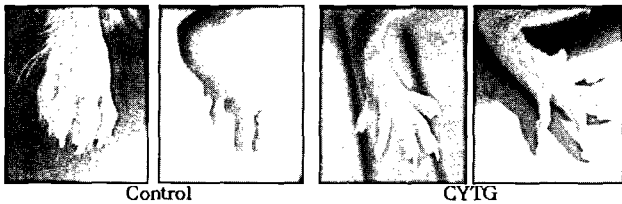


Fig. 4. Effect of CYTG on arthritis index in collagen-induced arthritis DBA1J mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Morphological changes of paw demonstrated described in Material and methods.

4. FACS를 이용한 세포 구성비에 미치는 영향

1) 림프절

림프절에서의 세포 구성비 분석 결과(Table 3), 약물 투여군의 경우 T-세포 특히 CIA에서 특징적인 미분화된 CD3+ T-세포의 비율이 79.6±5.48로 대조군 84.7±7.26에 비하여 감소하였고, CD19+ B-세포의 비율은 14.9±6.32로 대조군 14.2±5.76에 비하여 변화가 거의 없었다. 활성화된 T 세포(CD3+/CD69+)는 5.02±2.81로 대조군 11.02±3.17에 비하여 유의성 있게 감소되었다. CD4+ 또는 CD8+ T-세포의 비율은 감소하였지만 전체적인 변화는 없었다. 전체적으로 CYTG 처방은 림프절에서 활성화된 T-세포 CIA mice의 특징적 T-세포의 증가를 억제하였다. 그러나, 면역 억제성 regulatory T-세포의 표지중의 하나인 CD25의 발현은 4.43±0.29로 대조군 4.18±0.75에 비하여 증가되었다.

2) 비장

비장에서의 세포 구성비 분석 결과(Table 4), 약물 투여군에서 T-세포(CD3+)와 활성화된 T-세포(CD3+CD69+) 비율은 대조군에 비하여 각각 25.8±3.14에서 23.53±2.11로, 4.52±0.24에서 4.07±1.53로 감소되었으나, B 세포(CD19+), CD4+, CD8+ T-세포 비율은 증가하였다. FACS 분석 결과, CYTG는 비장세포에서 CIA mice의 미분화된 T-세포와 활성화된 T 세포(CD3+CD69)를 감소시켰다.

Table 3. Effects of CYTG on the cell contents of lymph nodes from CIA mice.

Leucocytes type	Organ	Normal DBA/1J	Collagen-induced arthritis mice	
			Control	CYTG
CD3+ (T)	LN*	85.9±2.37	84.7±7.26	79.6±5.48
CD19+ (B)	LN	10.17±1.52	14.2±5.76	14.9±6.32
CD3+ CD69+	LN	2.14±1.81	11.02±3.17	5.02±2.81
CD4+	LN	59.43±1.55	46±0.61	58.4±2.84
CD8+	LN	26.25±2.14	29±2.23	25.4±1.62
CD4+ CD25+	LN	3.95±0.64	4.18±0.75	4.43±0.29

* LN : Lymph node. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Results are mean ± SD (n=3 mice per group).

Table 4. Effects of CYTG on the cell contents of spleens from CIA mice.

Leucocytes type	Organ	Normal DBA/1J	Collagen-induced arthritis mice	
			Control	CYTG
CD3+ (T)	SP*	28.73±2.08	25.8±3.14	23.53±2.11
CD19+ (B)	SP	53.78±1.92	45.43±2.85	57.34±4.07
CD3+ CD69+	SP	3.52±0.74	4.52±0.24	4.07±1.53
CD4+	SP	8.41±2.21	12.06±2.1	17.48±1.17
CD8+	SP	3.47±0.17	4.95±4.21	5.25±0.32

* SP : spleen. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Results are mean ± SD (n=3 mice per group).

3) 비장세포의 regulatory T cell 및 CD11b Gr-1

(1) Regulatory T cell

면역 억제성 regulatory T-세포의 표지 중의 하나인 CD25의 비장세포에서의 발현은 1.88%에서 2.67%로 증가하였다. 그러나 CD25의 경우는 활성화된 T-세포에서도 나타나는 표지이므로 면역 억제성 regulatory T-세포와의 관련여부는 추가적인 실험이 필요하다(Fig. 5).

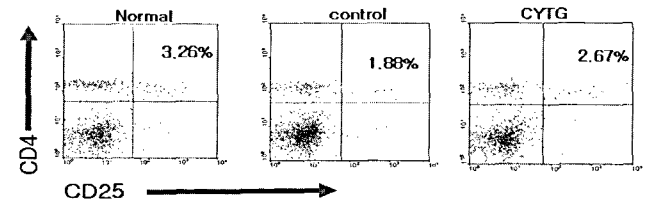


Fig. 5. Effect of CYTG on the CD4+CD25+ populations of the lymph nodes and spleen from CIA mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Results are mean ± SD(n=3 mice per group).

(2) granulocyte cell

비장세포에서 CD11b Gr-1 granulocytes population은 대조군에 비하여 21.39%에서 6.35%로 감소하였다. 과립성백혈구인 CD11b Gr-1의 감소는 염증의 억제 효능을 보여주는 것으로, CIA 동물모델에서 관절염 염증억제를 시사한다(Fig. 6).

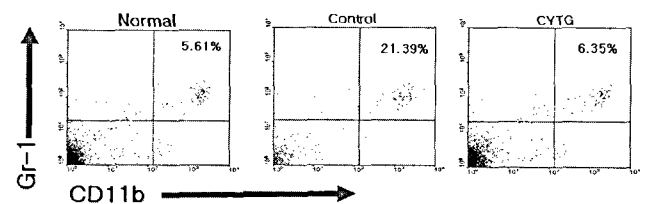


Fig. 6. Effect of CYTG on the Gr-1 and CD11b populations of the spleen joints from CIA mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Results are mean ± SD(n=3 mice per group).

5. 유전자 발현 변화에 미치는 영향

CYTG 처방이 CIA mice의 비장 세포 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time RT-PCR 분석법으로 비장 조직을 검사하였다. L32 유전자를 정량의 기준으로 하여 IL-2, IL-10, COX2 등 유전자 발현량의 변화를 조사하였다. IL-2, COX2에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IL-10에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7).

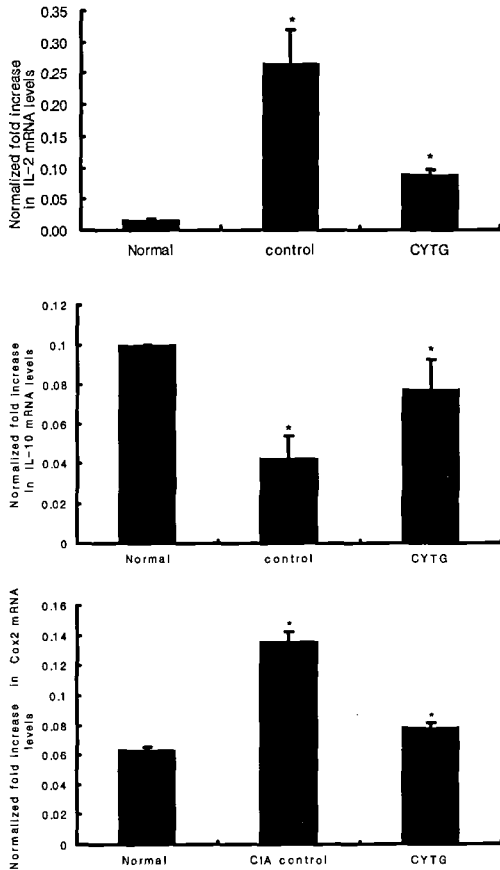


Fig. 7. Effect of CYTG on COX2 expression in spleen of CIA mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. Gene expression levels of COX2 was analyzed by real-time RT-PCR method as described in Methods section. Results are mean ± SD (n=3 mice per group). *p < 0.05 versus control group. y axis means normalized fold increase in COX2 mRNA levels, that is gene expression levels of COX2 normalized against those of L32 gene.

6. CYTG 처방이 IgG(RF)에 미치는 영향

CYTG 처방이 CIA mice의 자가면역 항체의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈청을 ELISA법으로 분석하였다. 류마티스 발병에 특징적으로 나타나는 자가 면역 항체 중의 하나인 IgG(RF)의 혈액내 양이 대조군의 402.8±190.57 mU/ml에 비하여 283.63±79.51 mU/ml로 감소하였다(Fig. 8).

7. 생쥐의 관절 조직학적 검사 결과

CIA 관절염 모델 동물에서 연골, pannus, 활액막의 invasion 과 infiltration 현상, 관절 내의 삼출물, 경계면의 파괴, 괴사된 연골, 관절 연골을 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin stain 및 Masson Trichrome stain을 이용하여 scoring기준에 따라 조직

병리학적 검사를 실시하였다(Table 5, 6, Fig. 9). 검사 결과 대조군의 경우 평균 약 4.5를 유지하였으나 처방 투여군은 평균 2.5를 나타내어 조직 병리 검사상 현격한 치료 효과를 확인하였다.

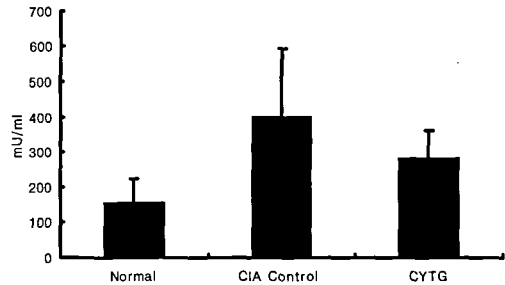


Fig. 8. Determination of IgG(RF) concentrations of sera from CIA mice. The CIA mice were administered with CYTG (CYTG, 400 mg/kg, p.o) for 4 weeks daily. IgG(RF) concentrations were analyzed by ELISA method as described in Methods section. Results are mean ± SD (n=3 mice per group).

Table 5. Histopathological scoring standard

Score	Inflammation	Pannus	Bone resorption
0	normal	none	none
1	minimal infiltration	minimal	minimal
2	mild infiltration	moderate	mild
3	moderate infiltration	severe	moderate
4	marked infiltration		marked
5	severe infiltration		severe

Table 6. Effect of CYTG on the histopathology of joint of murine CIA. Histopathological scoring.

	Histopathological findings	Histopathological scoring average
Normal Mouse	Not remarkable	0
CYTG	Pannus, minimal Cellular infiltration, minimal	2.5
CIA mouse	Pannus, minimal Cellular infiltration, mild Focal bone erosion, mild	4.5

Results are mean (n=3 mice per group).

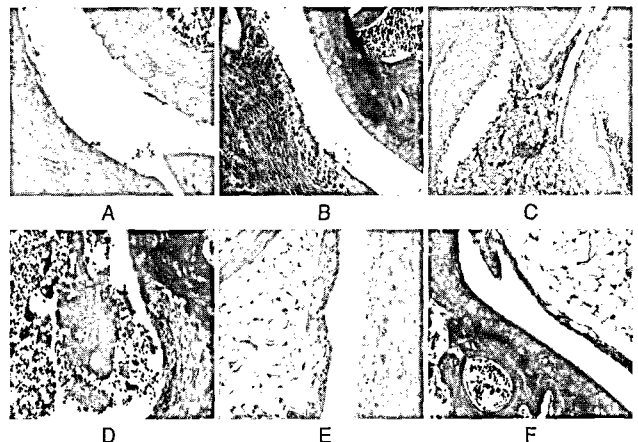


Fig. 9. Effect of CYTG on the histopathology of joint of murine CIA. DBA1/J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology as described in material and methods. Normal Mice (E and F) and CIA Mice were treated with PBS (C and D) or 400 mg/kg CYTG (A and B) following the detection of arthritis, arthritic knee joints were removed and stained with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome. Profound cartilage erosion and synovial infiltration (C and D) were observed in the controls (PBS-treated mice), whereas CYTG-treated mice exhibited significantly reduced histologic evidence of destruction and inflammation (A and B). Representative knee joints of mice from each group are shown.

고찰

류마티스 관절염은 면역학적으로 자가 면역 질환으로 알려져 있다. 자가 면역 질환은 체내에서 어떠한 원인에 의하여 체내 자연조작인 것을 외부항원으로 인식하고 항원항체반응을 나타내는 것으로, 이에 대한 기존의 연구들은 주로 자가 면역 기전의 억제제가 주를 이루어, 류마티스 관절염에서도 MTX, cyclosporin A 등 면역억제제가 사용된다. 한의학에서 류마티스 관절염은 歷節風, 脚氣, 類風濕性 관절염 등의 영역으로 風濕, 氣血虛 등 발병원인에 대한 치료를 중시하였으나, 자가 면역 반응을 유발하는 원인에 대한 치료에 중점을 두었다.

면역 억제 작용을 하는 대표적인 물질인 사이클로스포린(Cyclosporine)과 FK506은 T세포 활성화의 초기단계에 작용하여 탈인산효소(serine/threonine phosphatase)인 calcineurin과 결합하여 인산화효소(phosphatase) 활성을 저해시켜, T세포 수용체(receptor)에서 인터루킨(IL-2) 등의 사이토카인 생성에 이르는 정보전달경로를 차단한다. 이들은 calcineurin의 표적분자라고 추측되는 세포질 내의 NF-AT(nuclear factor of activated T cells)의 핵 내로의 이동을 막아 IL-2의 전사인자로서의 역할을 할 수 없게 함으로서 IL-2 생성을 억제시킨다. 이런 효과는 helper T 세포에서 특이하게 나타나는데, IL-2이외에도 interferon- γ 같은 여러 다른 사이토카인 생성도 억제한다. 이와 같이 NF-AT는 lymphokine(IL-2, gamma interferon)이 형성될 때 유전자 전사를 개시한다고 여겨지는 핵 구성요소이다. NF-AT의 핵 안으로 이동, NF-AT의 탈인산화나 translocation을 차단할 수 있으면 T-림프구의 활성화가 억제된다¹⁵⁻¹⁷.

실험에 쓰인 CIA 관절염 유발 동물 모델은 특징적으로 B림프구의 표면에서 IgG anti-collagen antibody가 방출되어 Type II Collagen에 특이 반응을 보인다. 이 항체가 고역치를 보이는 경우 관절염이 발생하는데, 일반적으로 항체와 관절염의 심한 정도는 관련이 있으므로 이를 측정하여 관절염의 객관적 지표로 이용한다. 관절염 유발은 교원질인 collagen-induced arthritis(CIA)와 Freubnd's complete adjuvant의 혼합액을 주입하는 방법을 사용하였다. 제II형 collagen은 연골, 귀, 추간판, 초자체, 각막, 망막에 국한되어 분포하고, 관절염골 교원질의 90% 이상을 차지하며, 연골 파괴의 표시자로 이용된다¹⁸. 또한 류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되고 질병의 진행과도 관계가 있음이 보고되었다. 따라서 쥐에게 피내 주사하여 관절염을 유발시킬 때는 Trentham 등이 처음 보고한 이후에는 제II형 collagen을 주로 사용한다.

Freubnd's complete adjuvant 관절염은 피부에 결핵균의 유성 혼합액을 주사하여 2주간의 기간을 거쳐 증상을 발현시키는 방법인데 유발인자의 성분인 eptidoglycan과 비장의 종대, 체중 감소, 백혈구 증가 등의 전신 증상이 류마티스 관절염과 유사한 점이 많아 실험적 연구를 위한 모델로 많이 사용되고 있다¹⁹.

류마티스 관절염 환자의 관절 내에서 많은 림프구의 침윤이 발견되는데 일반적인 면역반응과 같이 선천면역(innate immunity)반응 이후 후천면역(acquired immunity) 반응이 발생

할 것으로 추측된다. 콜라겐 유도 관절염(collagen induced arthritis)의 동물모델에서 관절염은 항원 주입 2-4 주 후에 발생하는데 이는 세포성 면역(cellular immunity)과 체액성 면역(humoral immunity)이 광범위하게 발생할 시간이 필요하므로 판단된다. 두 단계에 걸쳐 관절염이 진행되는 데 약 12일까지가 초기 단계로 관절 증상을 보이기 전에 관절내 fibrin이 침착되며 활막의 증식(synovial hyperplasia)이 관찰된다²⁰. 그러나 이 단계에서 림프구의 침윤은 발견되지 않는다. 콜라겐 없이 항원보강제(adjuvant)만 주입한 경우에는 관절염은 발생하지 않지만 활막의 변화는 나타나므로 관절염의 시작단계는 항원에 비특이적임을 의미한다.

류마티스 관절염의 활막 T세포를 in vitro에서 자극하면 IFN 같은 사이토카인을 다량 분비하지만 실제 환자의 활액에서는 소량의 사이토카인이 관찰된다. 최근 연구에서 류마티스 관절염의 활액 내 IL-2와 같은 효과를 나타내는 것은 IL-2에 의한 것이 아니고²¹ 인체백혈구항원 DR 유도 인자(HLA-DR-inducing factor)인 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)에 의한 것이라고 보고되었다. 또한 T 세포에서 생성된 사이토카인이라고 생각된 TNF- α , GM-CSF, IL-6 등도 대식세포나 활막의 섬유아세포에서 분비되는 것으로 생각된다.

류마티스 관절염 환자의 관절 내에서 T 세포가 분비하는 사이토카인들의 농도가 다른 항원 특이 T 세포 매개 자가 면역 질환에 비해 낮으며 오히려 macrophage나 fibroblast에서 분비되는 물질들이 많다. 따라서 이와 같은 소견은 T 세포가 류마티스 관절염의 발생기전에 있어 중요한 역할을 하지 않는 것처럼 보이게 하지만²²⁻²⁴, T 세포는 낮은 농도의 사이토카인을 생성한다^{25,26}. 최근 이러한 연구에 의해 T 세포의 중요성이 강조되고 있으며, RA 발병에 T 림프구가 중요한 역할을 한다는 예는 RA 환자의 관절조직에서 T 림프구로 구성된 림프소절(lymphnode)이 관찰되고, 이 세포들이 oligoclonal selectivity를 변화시키는 제한된 TCR 구조를 통하여 볼 수 있다²⁷.

T 세포를 표적으로 하는 임상적 시도에서 부분적인 효과를 거둔 것은 T 세포가 병적 단계를 유지하는데 중요한 역할을 함을 시사한다. RA와 임상적 소견이 유사하여 RA의 동물 모델로 널리 이용되는 collagen-induced arthritis와 adjuvantarthritis 모델에서 CD4+ T 세포는 일련의 염증 반응의 중심에 있다.

류마티스 관절염은 유전적 및 환경적인 원인에 의해 유발되어 면역 세포의 편향된 분화를 야기한다. 즉, 세포 매개성(Cell-mediator immune response) 면역 반응에서 CD4 T세포 중 Th1 세포가 Th2 세포보다 과다하게 편향되어 분화되고 활성화되어 Th1 cytokine이 Th2 cytokine 보다 다량으로 생산되어 관절염이 유발되는 것으로 보고되고 있다²⁸.

관절염 환자에게서 대표적인 염증성 매개물인 PGE2 (prostaglandin E2)가 대량으로 발견되는데, cyclooxygenase-2가 발견되어 그 활성이 높아지면 PGE2가 많이 생산된다. Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려져 있는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량

의 prostanoid는 염증 반응을 가속시킨다²⁹⁾.

한의학에서 류마티스 관절염은 병태와 임상증상을 비추어 보았을 때 痺證의 범주에 속한다³⁰⁾. 痺證에는 류마티스 關節炎 뿐만 아니라 痛風, 좌골신경통 및 骨關節炎 등이 범주에 속한다. 최근 中醫學에서는 류마티스 관절염을 類風濕性 關節炎³¹⁻³³⁾이라 부르고 內因과 外因으로 나누어 內因으로는 氣血虛弱, 肌表不固, 勞倦內傷을 제시하고 外因으로는 風寒濕熱의 外邪와 外傷, 患者의 營養, 勞動, 起居條件과 밀접한 것으로 인식하고 있다.

中醫學의 類風濕關節炎 치료변증은 크게 첫째 風寒濕邪가 經絡을 침입한 것, 둘째 濕熱阻絡 毒邪熾盛, 셋째 痰瘀血凝滯, 넷째 肝腎虧損 邪氣留滯로 나누어지는데²⁶⁾, 유형별로 구분하면 風寒濕 邪氣의 實證과 虛症으로 대별된다.

『東醫壽世保元』의 清心蓮子湯은 蓮子肉 山藥 2錢 天門冬 麥門冬 遠志 石菖蒲 酸棗仁 龍眼肉 柏子仁 黃芩 蘿蔔子 1錢 甘菊 3分이지만, 관절염에 사용하는 清心蓮子湯 加味方은 本方을 약간 증량(2錢을 10g으로 1錢을 5g으로)한 후에 薏苡仁 30g을 넣어 君藥을 만들고 다시 桑枝 海桐皮를 10g, 杏仁 續斷 竹茹 五味子 威靈仙 蒲黃을 각 5g을 추가로 넣은 것으로³⁴⁾ 류마티스 관절염에 좋은 효과를 나타낸다³⁵⁾. 薏苡仁은 味甘 皮寒 無毒하며 肺脾經으로 들어가서 祛風濕 理脚氣拘攣³¹⁾ 작용이 있다고 하였다. 그 性은 涼하고 味는 甘淡하여 脾胃肺에 入한다. 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿의 효능이 있어 水腫脚氣, 濕痺拘攣 등을 치료한다고³²⁾ 하였고, 또한 민간요법 관절염 치료제에 최다 언급된 본초로 알려져 있다³³⁾.

加味清心蓮子湯에서 IL-2 억제에 효과를 보이는 약물을 중심으로 재처방하여 콜라겐 유발 관절염 동물모델에 대한 치료효과 실험을 하였다.

NF-AT reporter assay를 통하여 약재를 선별하였다. Jurkat T-세포 자극원인 PMA/ionomycin으로 처리한 후 Real-time RT-PCR 법으로 유전자의 발현량을 확인한 결과, IL-2, IFN- γ 는 유의성있게 감소하였고 IL-10은 유의성있는 변화가 없었다. FACS를 이용하여 세포 조성비를 확인한 결과 전체적으로 CYTG 처방은 림프절에서 활성화된 T-세포 CIA mice의 특징적 T-세포의 증가를 억제하였고, 비장세포에서 미분화된 T-세포와 활성화된 T 세포(CD3+CD69)를 감소시켰다. Real-time RT-PCR 분석법으로 비장 조직을 검사한 결과, IL-2에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IL-10에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 혈청을 ELISA법으로 분석한 결과, 류마티스 발병에 특징적으로 나타나는 자가 면역 항체 중의 하나인 IgG(RF)의 혈액내 양이 대조군에 비하여 감소하였다. 이상의 결과를 통하여 CYTG는 면역조절능력이 있음을 확인하였다.

Jurkat T-세포 자극원인 PMA/ionomycin으로 처리한 후 Real-time RT-PCR 법으로 유전자의 발현량을 확인한 결과, COX2를 억제함을 확인하였다. 염증의 표현증상을 측정하는 Arthritis index에서 대조군에 비하여 약물 투여군의 수치가 현저히 감소하였다. FACS를 이용하여 세포 조성비를 확인한 결과 비장세포에서 과립성백혈구인 CD11b Gr-1 granulocytes population이 대조군에 비하여 감소하였다. Real-time RT-PCR

분석법으로 비장 조직을 검사한 결과, COX2에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이상의 결과를 통하여 CYTG는 항염증 효능이 있음을 확인하였다.

FACS를 이용하여 세포 조성비를 확인한 결과 비장세포에서 면역 억제성 regulatory T-세포의 표지중의 하나인 CD25의 발현이 대조군에 비하여 증가되었다. 이것으로 Treg 조절효과의 가능성이 있지만 CD25의 경우는 활성화된 T-세포에서도 나타나는 표지이므로 면역 억제성 regulatory T-세포와의 관련여부는 추가적인 실험이 필요하다.

참고문헌

- 오정희. 재활의학. 서울, 대학서림. pp 309-319, 1986.
- 손희천, 금동호, 이명종. 해동피가 콜라겐 유발 흰쥐의 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 13(1):67-76, 2002.
- 정수현, 김순중, 서일복. 대강활탕이 Collagen으로 유발된 관절염의 발생 및 치료에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 14(3):79-101, 2004.
- 우석, 금동호, 이명종. 위령선이 관절염 유발 동물모델의 소염, 진통 및 해열작용에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 14(2):75-84, 2004.
- 윤일지, 최승훈, 오민석. 활혈탕가미가 Collagen 유발 관절염의 발생과 치료에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 14(3):53-70, 2004.
- 곽중문, 오민석, 박종오, 김동희. 소풍활혈탕가미방이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 관한 연구. 동의생리병리학회지 16(4):810-817, 2002.
- 장선일, 윤용갑. DBA1J 마우스에서 가감보종익기탕이 콜라겐 유도 관절염 억제에 미치는 효과. 본초학회지 18(3):143-151, 2003.
- 조남훈, 강성길, 이재동. 관절염 관련 병독 연구에 대한 문헌적 고찰. 침구과학회지 20(6):13-26, 2003.
- 이한창, 염미정, 김건호, 심인섭, 최강덕, 이해정, 함대현. 흰쥐의 Adjuvant 유발 다발성 관절염에 대한 마황 약침의 치료 효과. 동의생리병리학회지 17(2):346-351, 2003.
- 주임산, 안택원, 이현. 청심연자탕과 태음조위탕이 Wistar rat의 노화에 미치는 영향. 사상의학회지 17(2):74-84, 2005.
- 한병삼, 배영춘, 송승연, 박혜선, 이재흥, 김경요, 청심연자탕의 항산화 효과와 기전에 관한 연구. 사상의학회지 16(1):130-147, 2004.
- 박승찬. 태음인 청심연자탕의 항allergy 작용에 대한 실험적 연구. 사상의학회지 15(2):166-179, 2003.
- Shin, S.S., Jin, M., Jung, H.J., Kim, B., Jeon, H., Choi, J.J., Kim, J.M., Cho, B.W., Chung, S.H., Lee, Y.W., Song, Y.W., Sunyoung Kim. Suppressive effects of PG201 an ethanol extract from herb on collagen-induced arthritis in mice. Rheumatology 42:1-8, 2003.
- Joosten, L., Lubberts, E., Durez, P., Hetsen, M., Van den

- Berg W.B. Role of interleukin 1 and interleukin 10 murine collagen induced arthritis, protective effect of interleukin 1 and interleukin 10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 40:219-220, 1997.
15. Sugita, T., Ueno, M., Furukawa, O., Murakami, T., Takata, I., Tosa, T. Effect of novel anti-rheumatic drug, TA-383, on type II collagen induced arthritis; suppressive effect of TA-383 on interleukin 6 production. *Int Immunopharmacol*, 15:515-519, 1993.
 16. Jusko, W.J., Thomson, A.W., Fung, J., et al. Consensus Document: Therapeutic Monitoring of Tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* 17(6):606-614, 1995.
 17. Laskow, D.A., Vincenti, F., Neylan, J., et al. Phase II FK506 Multicenter Concentration Control Study: One-Year Follow-up. *Transplant Proc* 27(1):809-811, 1995.
 18. Yokoyama, I., Uchida, K., Fukao, K., et al. FK506: Long-Term Study in Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 27(1):818-821, 1995.
 19. 박동준 외. 흰쥐에서 제II형 collagen 유발된 관절염의 임상 양상 및 면역반응. 카톨릭대학 의학부 논문집. 서울. 43(2):451-468, 1990.
 20. 의학교육연구원. 가정의학. 서울, 서울대학교출판부 pp 123-125, 132-134, 1987.
 21. Williams, R.O., Marinova-Mutafchieva, L., Fuma, K., Maini, R.N., Zvaifler, N.J. Joint inflammation in experimental arthritis is preceded by tumor necrosis factor -dependent infiltration of the synovium by esenchymal cells. *Arthritis Rheum* 46:507-513, 2002.
 22. Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J., Firestein, G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-mediated induction of class II MHC antigen on human monocytes: a possible role in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 170:865-875, 1989.
 23. Firestein, G.S., Xu, W.D., Townsend, K., et al. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 168:1573-1586, 1988.
 24. Firestein, G.S., Zvaifler, N.J. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gammainterferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 30:864-871, 1987.
 25. Firestein, G.S., Alvaro-Gracia, J.M., Maki, R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 144:3347-3353, 1990.
 26. Miossec, P., Naviliat, M., Dupuy, D., Angeac, A., Sany, J., Banchereau, J. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 33:1180-1187, 1990.
 27. Chen, E., Keystone, E.C., Fish, E.N. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36: 901-910, 1993.
 28. Wagner, U.G., Koetz, K. Weyand CM, Goronzy JJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14447-14452, 1998.
 29. Veihelmann, A., Hofbauer, A., Korombach, F., Dorger, M., Maier, M., Refior, H.J., Messmer, K. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology*, 41:509-517, 2002.
 30. Stasiuk, L.M., Abehsira-Amar, O., Fournier, C. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice :cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cell immunol*, 173:269-275, 1996.
 31. 손희천, 금동호, 이명종. 해동피가 콜라겐 유발 흰쥐의 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 13(1):67-76, 2003.
 32. 袁玉紅. 關節痛丸治療類風濕性關節炎 93例. *河北中醫*. 21(1): 65-67, 1999.
 33. 沈曉燕. 類風濕性關節炎中醫研究的策略. *中醫臨床雜誌*. 11(4): 216-218, 1999.
 34. 陳進春. 從痰論治類風濕性關節炎 67例. *遼寧中醫雜誌*. 26(8): 366, 1999.
 35. 박지우. 사상체질진단법. 행림출판. p 220, 1999.
 36. 편성범. 加味清心蓮子湯이 콜라겐 유발 관절염 모델에 미치는 효과. 대전대학교 한의과대학 박사학위논문, 2006.