

Collagen II-induced Arthritis 생쥐에 대한 杜仲·續斷 배합약물의 관절염 억제 효과

이부균¹, 이영철², 이장천^{3,*}

1: 삼존한의원

2: 상지대학교 한의과대학 본초학교실

3: 부산대학교 한의학전문대학원 본초방제학교실

Inhibitory Effect of a Decoction of *Eucommiae ulmides* OLIVER and *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T.M.Ai on Collagen II-induced Arthritis Mice

Boo-Kyun Lee¹, Young-Cheol Lee², Jang-Cheon Lee^{3,*}

1: Samzon Oriental Clinic

2: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University

3: Dept. of Prescriptionology, School of Oriental Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : The object of this study was to verify the inhibitory effect of a decoction of *Eucommiae ulmides* OLIVER (EU) and *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T.M.Ai (DA) on Collagen II-induced Arthritis Mice (CIA mice).

Methods : DBA/10IaHsd mice were immunized with bovine type II collagen. Boostnig same collagen 21 days later, arthritis was induced and then administrated orally the extract of EU+DA (200 or 50 mg/kg) once a day for 4 weeks and compared with that of methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) as a positive control.

Results : Administration of EU+DA suppressed the inflammatory progression of CIA mice and the results were

1. Arthritis index of CIA mice was decreased
2. EU+DA decreased the production of TNF- α , IL-6, IL-1 β in the serum of CIA mice.
3. EU+DA decreased the level of IgM.
4. EU+DA increased CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD25 but decreased CD19⁺, CD3⁺/CD49b⁺(NKT), CD3⁺/CD49b⁺ (NK), B220⁺/CD23⁺ in PBMC of CIA mice.
5. EU+DA decreased CD3⁺, CD4⁺, CD3⁺/CD69⁺ of paw joint in CIA mice.
6. EU+DA decreased subsynovial inflammation.

Conclusions : This results demonstrated that extract of EU+DA suppressed the inflammatory progression of CIA mice and supported further studies are required to clarify a mechanism of therapeutic role.

Key words : *Eucommiae ulmides* OLIVER, *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T.M.Ai, arthritis, CIA Mice model

* 교신저자 : 이장천, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의한의학전문대학원
· Tel : 051-510-8459 · E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr
· 접수 : 2010년 2월 19일 · 수정 : 2010년 3월 17일 · 채택 : 2010년 3월 22일

서론

고령화 시대와 더불어 증가하고 있는 대표적 질환인 관절염은 국내에서도 환자가 증가하고 있는 추세이다. 우리나라의 경우 2005년 평생의사진단 골관절염 유병율(지금까지 한 번이라도 의사로부터 골관절염(퇴행성 관절염)진단을 받은 사람의 비율)은 인구 1,000명 당 전체 102.5명(남자 50.5명, 여자 153.7명)이고 평생의사진단 류마티스관절염 유병율은 인구 1,000명 당 전체 18.5명(남자 10.1명, 여자 26.8명)으로 두 관절염 모두 연령이 높을수록 증가 추세를 보이며¹⁾, 특히 노인성 만성 질환에 이환된 사람들의 '삶의 질'을 피폐하게 하는²⁾ 근골격계 질환이다. 관절염은 관절의 정상적인 기능이 손상되어 나타나는 결과를 표현하는 임상적인 용어로서³⁾ 연골과 골의 소실에서 기인하는 관절형상의 변화, 변성과 복원 소견을 보이는 세포-조직의 변화, 연골의 침식, 연골하 낭종, 골연골 유체체의 존재, 관절 주위 인대 및 관절막 조직의 열상과 반흔, 활액막의 비후 증식 등의 구조물의 변화가 나타난다⁴⁾.

《黃帝內經》에서 痺病의 의미는 기본적으로 '閉塞不通'이며 廣義로는 일체 臟腑·器官·組織의 氣機가 阻滯되어 발생하는 증상이고 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 運轉을 방해하고 經絡의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 부자연스러운 증상을 뜻한다⁵⁾. 이 중 狹義의 痺病을 본 논문에서 논의하는 관절염으로 본다.

杜仲은 두충과(杜仲科: *Eucommiaceae*)에 속하는 낙엽교목인 杜仲나무(*Eucommia ulmoides* Oliv.)의 樹皮(*Eucommiae ulmoides Oliver*)이며 효능은 補肝腎, 強筋骨⁶⁾이고, 心血管系에 작용하여 항고혈압 작용과, 혈액중의 총 콜레스테롤 함량을 저하시키며, 항산화 작용, 항피로 및 스트레스 완화 작용을 하며 피부에 대한 작용으로 collagen 합성을 개선시킨다고 알려져 있다⁷⁾.

續斷은 산토끼과(川續斷科: *Dipsacaceae*)에 속하는 다년생 초본 川續斷(*Dipsacus asper* Wall. 및 산토끼꽃. *D. Japonicus* Miq.)의 뿌리(*Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T.M.Ai)이며, 효능은 補肝腎, 續筋骨, 調血脈⁶⁾이다.

관절염 치료에 관한 최근 한의학적 연구로 최⁸⁾ 등은 한국·중국·일본을 중심으로 1999년부터 2004년까지 발표된 실험논문을 검색하여 류마티스 관절염 치료에 활용된 한약 및 처방의 경향을 파악하였고, CIA 모델에서 한약제의 관절염 효과에 대한 연구로는 任⁹⁾이 二妙散이 류마티스 관절염의 유발을 억제할 수 있음을 제시하였고, 宋¹⁰⁾ 등은 CIA rats에 대한 유근피 추출액 시술을 통한 항염증 작용과 활막세포의 G-protein-AC-cAMP transmembrane signal transduction 형질도입신호에 의한 치료 기전을 金¹¹⁾은 白芥子の 항관절염 효과를 규명하였다.

이에 저자는 한의학에서 痺證의 病因과 症狀이 현대의 관절염 病因, 症狀과 부합하는 부분이 많아, 임상에서 다

양하게 활용되고 있는 杜仲·續斷 배합¹²⁾의 관절염 치료 효과를 규명하고자, DBA/10IaHsd 생쥐에 collagen II를 감작시켜 관절염을 유도한 후 杜仲과 續斷을 배합한 전당액을 투여하여 항관절염의 효과를 관찰하였고, 양성 대조군으로는 methotrexate (MTX)를 사용하여 효능을 비교하였다.

이러한 방법으로 杜仲·續斷의 배합약물이 관절염 치료 효과에 미치는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 폴라스 인터내셔널(Seoul, Korea)에서 분양받은 6주령의 암컷 DBA/10IaHsd를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2°C, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품질사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 杜仲(*Eucommiae ulmoides* OLIVER : EU)과 續斷(*Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T.M.Ai : DA)은 한국 서울 소재의 경동시장에서 구입하여 기원의 진위와 품질의 상태를 상지대학교 본초학교실에서 검정한 후 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete Freund's adjuvant, methotrexate, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, TMB, antibody biotin-conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate, trypsin-0.2% EDTA, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethylthio)phenyl-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DR), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, D-PBS 등은 Sigma 사(USA)를, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사(Japan)를, 인간 재조합 TNF-α와 IL-1β는 R&D system사(Minneapolis, USA)를, PE-anti-CD3, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, FITC-anti-B220, PE-anti-Gr-1 PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b는 Pharmingen사(Torreyana, Iraq)를, anti-

CD28, anti-CD3는 (Serotec, USA)를, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 Endogen, USA 등의 시약과 기기를 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

杜仲과 續斷의 배합처방(EU+DA)은 杜仲, 續斷 각 200 g을 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 감압 추출장치로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조(20.4 g)한 후, 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Collagen 유발 관절염(CIA) 생쥐 모델

DBA/10IaHsd 생쥐에 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg를 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/10IaHsd 생쥐 5마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) 처리한 양성 대조군과 EU+DA 배합약물 투여군으로 나누었다.

3) 시료 투여

DBA/10IaHsd 생쥐 5 마리씩을 한 군으로 하여 정상군(Normal group), 치료제를 처리하지 않은 대조군(Control-CT), 그리고 methotrexate (0.3 mg/kg) 처리군(MTX), EU+DA 처리군으로 나누어 booster 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성 대조군은 MTX (0.3 mg/kg)를 매주 3회 각각 0.1 ml씩 매일 복강에 주사하였으며, EU+DA (200, 50 mg/kg) 처리군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) Arthritis index (AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/10IaHsd 생쥐의 각 4개 발에서 관절염 징후에 따라, 작은 정도의 관절염 1, 가벼운 부종 2, 중간 정도의 부종 3, 심한 부종 4, 심한 부종과 체중을 지탱할 수 없음 5 점의 CIA 유발 정도를 1주일에 1회씩 4주간 기록하였다.

5) 형광 유세포 분석

PBMC (peripheral blood mononuclear cell)는 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포 수를 측정하였다.

측정한 PBMC 세포를 5×10⁵/ml 세포로 조정된 후 4°C에서 면역 형광염색(immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석하였다.

6) 혈청 내 사이토카인 및 rheumatoid factor (RF) 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF-α 그리고 RF인 총 IgG와 IgM 농도를 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 비장세포 내 IFN-γ 및 IL-4 의 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포는 anti-CD28 (1 µg/ml) 항체와 anti-CD3 (1 µg/ml), 그리고 collagen type II (1 mg/ml)로 96-well Costar 접시에서 coating된 plate에서 48시간 동안 동시 배양되었다. 각 well에 생쥐의 비장세포 배양상층액 100 µl씩을 분주하고, 1시간 동안 실온에 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 µl의 stop용액으로 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 병리조직검사

약물 투여 4주일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정된 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, epoxy에 포맷하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 unpaired Student's *t*-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 관절염 유발률에 미치는 영향

관절염 유발 후 arthritis index값을 매주 한 번씩 4주 동안 검사한 결과, 약물을 처리한 후 1주부터 MTX 투여군과 EU, DA 두 배합약물 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성(* : *p* < 0.05, *** : *p* < 0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1).

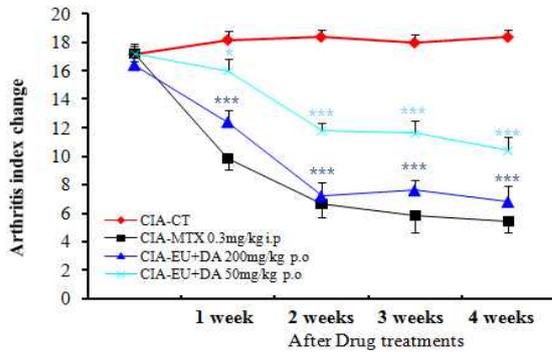


Fig. 1. Suppressive effect of EU+DA on arthritis index of paw joint in CIA mice

Arthritis index were scored according to Mann-Whitney *u* test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into four groups and each group was treated with DW (CIA-CT), MTX (CIA-MTX ; 0.3 mg/kg) or EU+DA (CIA- EU+DA ; 200 or 50 mg/kg) or in a daily base. Normal mice without injection of collagen and Complete Freund's adjuvant were treated with DW. Statistically significant value compared with CIA-CT by *t*-test (*n* = 5, * : *p* < 0.05, *** : *p* < 0.001).

2. 면역세포에 미치는 영향

1) PBMC 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3⁺ & CD19⁺ 발현에 미치는 영향

PBMC 내 CD3⁺ 및 CD19⁺ 세포 수 변화를 측정된 결과, 정상군이 각각 47.3 ± 0.8%, 48.0 ± 5.5% 대조군이 각각 31.6 ± 2.7%, 61.4 ± 4.35%, MTX 투여군이 61.9 ± 5.3%, 32.0 ± 0.7%, EU + DA 50 mg/kg 투여군이 36.7 ± 3.1%, 39.9 ± 7.0%, EU + DA 200 mg/kg 투여군이 50.6 ± 6.0%, 41.8 ± 1.3%로 나타나, 200 mg/kg에서 대조군에 비하여 CD3⁺는 증가, 모든 농도에서 CD19⁺ 세포

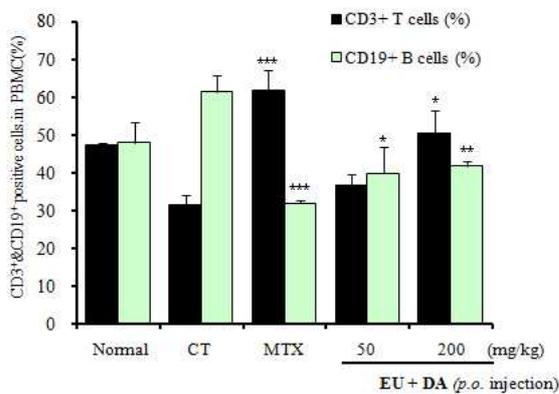


Fig. 2. Effects of EU+DA on proportion of CD3⁺ & CD19⁺ cells in peripheral blood mononuclear cells of collagen induced arthritis mice

Peripheral blood mononuclear cells (10⁶ cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of EU+DA. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3 & anti-CD19 antibody and analyzed by flow cytometer (*n* = 5, * : *p* < 0.05, ** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001).

수는 유의성(* : *p* < 0.05, ** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001) 있게 감소되었다(Fig. 2).

(2) CD3⁺/CD49b⁺ NKT & CD3⁻/CD49b⁺ NK세포 발현에 미치는 영향

PBMC 내 CD3⁺/CD49⁺ 및 CD3⁻/CD49⁺ 세포 수 변화를 측정된 결과, 정상군이 각각 2.2 ± 0.1%, 5.8 ± 0.9%, 대조군이 7.7 ± 0.33%, 5.8 ± 0.03%, MTX 투여군이 3.9 ± 0.16%, 4.2 ± 0.41%, EU+DA 50 mg/kg 투여군이 4.8 ± 0.07%, 4.4 ± 0.02%, EU+DA 200 mg/kg 투여군이 3.3 ± 0.07%, 4.0 ± 0.55%로 나타나 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성(** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001) 있게 감소되었다(Fig. 3).

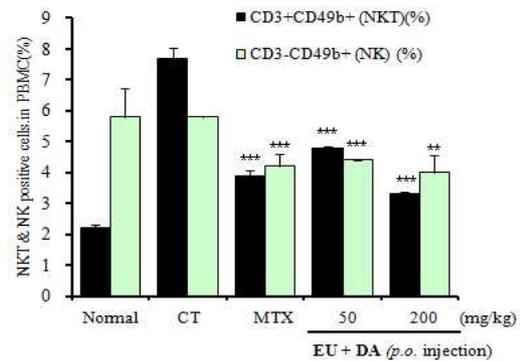


Fig. 3. Effects of EU+DA on proportion of CD3⁺/CD49b⁺ & CD3⁻/CD49b⁺ cells in PBMC of CIA mice

PBMC (10⁶ cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of EU+DA. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3 & PE-conjugated anti-CD49 antibody and were analyzed by flow cytometer (*n* = 5, ** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001).

2) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3⁺ 세포, CD4⁺ 세포 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD3⁺ 세포, CD4⁺ 세포 수를 absolute

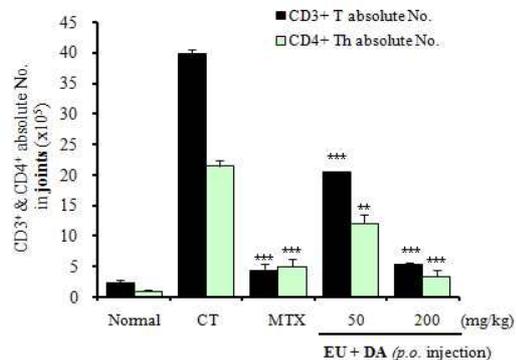


Fig. 4. Effects of EU+DA on the absolute number of CD3⁺ & CD4⁺ cells in paw joint of CIA mice

Paw joint cells(10⁵cells/ml) were isolated following 4-weeks administration of EU+DA. Cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3, CD4 antibody, and were analyzed by flow cytometer (*n* = 5, ** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001).

number로 산출한 결과, 각각 정상군이 $2.5 \pm 0.4 (\times 10^5)$, $1.1 \pm 0.1 (\times 10^5)$, 대조군이 $39.9 \pm 0.6 (\times 10^5)$, $21.5 \pm 1.0 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $4.4 \pm 1.1 (\times 10^5)$, $5.0 \pm 1.2 (\times 10^5)$, EU+DA 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군은 $20.5 \pm 0.2 (\times 10^5)$, $12.1 \pm 1.5 (\times 10^5)$, EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은 $5.4 \pm 0.3 (\times 10^5)$, $3.5 \pm 0.9 (\times 10^5)$ 로 나타나, EU+DA 50, 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의성(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 있게 감소되었다(Fig. 4).

(2) CD4⁺/CD25⁺ & CD3⁺/CD69⁺ 세포 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD4⁺/CD25⁺ & CD3⁺/CD69⁺ 세포 수를 absolute number로 산출한 결과, 각각 정상군이 $1.8 \pm 0.2 (\times 10^5)$, $2.2 \pm 0.7 (\times 10^5)$, 대조군이 $1.9 \pm 1.5 (\times 10^5)$, $23.8 \pm 3.5 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.2 \pm 0.7 (\times 10^5)$, $5.0 \pm 1.5 (\times 10^5)$, EU+DA 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군은 $4.7 \pm 2.3 (\times 10^5)$, $13.5 \pm 1.5 (\times 10^5)$, EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은 $4.6 \pm 2.0 (\times 10^5)$, $3.4 \pm 0.1 (\times 10^5)$ 로 나타나, EU+DA 50, 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 CD3⁺/CD69⁺ 세포 수가 대조군에 비하여 유의성(* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$) 있게 감소되었다(Fig. 5).

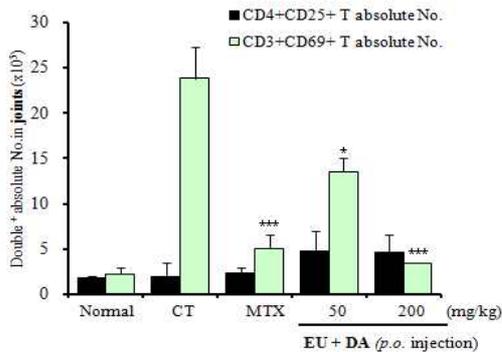


Fig. 5. Effects of EU+DA on the absolute number of CD4⁺/CD25⁺ & CD3⁺/CD69⁺ cells in paw joint of CIA mice

Paw joint cells (10^5 cells/ml) were isolated following 4-weeks administration of EU+DA. Cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4, CD3 antibodies and PE-conjugated anti-CD25, CD69 antibodies, and were analyzed by flow cytometer ($n = 5$, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$).

3) 혈청 내 전염증성 사이토카인 생성량에 미치는 영향

혈청 내 TNF- α 생성량을 분석한 결과, 정상군이 22.1 ± 2.8 (pg/ml), 대조군이 126.2 ± 37.3 (pg/ml), MTX 투여군이 34.9 ± 7.8 (pg/ml)이었으며, EU+DA 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 109.2 ± 27.6 (pg/ml), EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 75.0 ± 3.2 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 6).

혈청 내 IL-6 생성량을 분석한 결과, 정상군이 8.6 ± 0.7 (pg/ml), 대조군이 48.3 ± 8.4 (pg/ml), MTX 투여군이 15.0 ± 8.1 (pg/ml)이었으며, EU+DA 50 mg/kg 농도

로 투여한 실험군이 51.7 ± 9.1 (pg/ml), EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 23.8 ± 1.0 (pg/ml)이었다(Fig. 6).

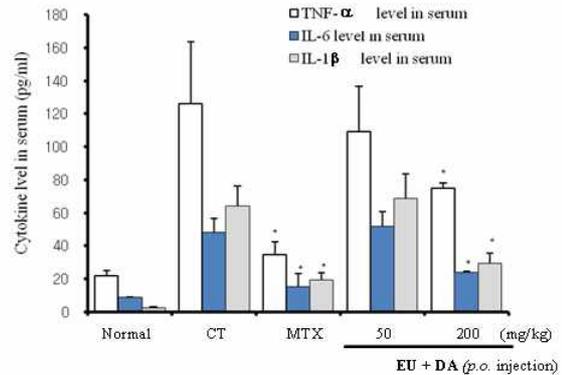


Fig. 6. Effects of EU+DA on the level of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the serum of collagen induced arthritis mice

Serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and was stored at -20°C until used. The levels of cytokines were determined by a commercially available ELISA kit ($n = 5$, * : $p < 0.05$).

혈청 내 IL-1 β 생성량을 분석한 결과, 정상군이 2.4 ± 0.6 (pg/ml), 대조군이 63.9 ± 12.5 (pg/ml), MTX 투여군이 19.2 ± 4.4 (pg/ml)이었으며, EU+DA 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 68.8 ± 14.7 (pg/ml), EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 29.3 ± 6.4 (pg/ml)이었다(* : $p < 0.05$)(Fig. 6).

4) Rheumatoid factor (RF)에 미치는 영향

혈청 내 IgG 농도를 분석한 결과, 모든 실험군에서 감소되었으나, 유의성(*** : $p < 0.001$)은 없었으며(Fig. 7), IgM 농도를 분석한 결과, 정상군이 270.0 ± 20.0 (mU/ml), 대조군이 $10,120.0 \pm 1750.0$ (mU/ml), MTX 투여군이 $1,700.0 \pm 1,110.0$ (mU/ml), EU+DA 50 mg/kg 농도로 투

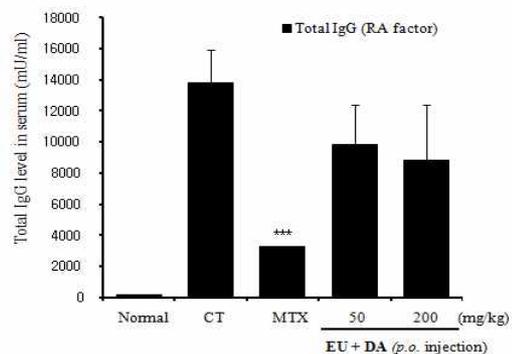


Fig. 7. Effects of EU+DA on levels of total IgG in the serum of CIA mice

Serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and was stored at -20°C until used. The levels of IgG rheumatoid factor were determined by a commercially available ELISA kit ($n = 5$, *** : $p < 0.001$).

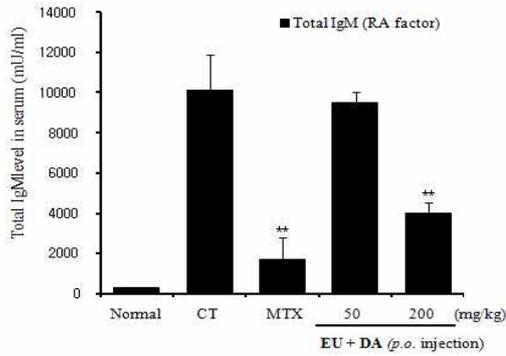


Fig. 8. Effects of EU+DA on levels of tota IgM in the serum of CIA mice

Serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and was stored at -20° C until used. The levels of IgM rheumatoid factor were determined by a commercially available ELISA kit (n = 5, ** : p < 0.01).

여한 실험군이 9,480.0 ± 530.1 (mU/ml), EU+DA 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 3,975.0 ± 535.1 (mU/ml) 로 나타나 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 대조군에 비해 유의성(** : p < 0.01) 있게 감소되었다(Fig. 8).

5) CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IFN-γ & IL-4 생성량에 미치는 영향

IFN-γ 및 IL-4 생성량은 CD3/CD28로 활성화된 정상군이 각각 1,415.0 ± 107.3 (pg/ml), 2,499.5 ± 261.5 (pg/ml), 대조군이 2,657.3 ± 224.8 (pg/ml), 2,156.8 ± 183.8 (pg/ml), MTX 투여군이 1,210.0 ± 287.0 (pg/ml), 1,469.0 ± 211.0 (pg/ml), EU + DA 50 mg/kg 투여군이 1,828.8 ± 215.8 (pg/ml), 2,424.3 ± 131.3 (pg/ml), EU + DA 200 mg/kg 투여군이 1,566.3 ± 149.3 (pg/ml), 2,827.5 ± 54.5 (pg/ml)로 나타나 두 실험군에서 IFN-γ가 대조군에 비하여 유의성(* : p < 0.05, *** : p < 0.001) 있게 감소되었다(Fig. 9).

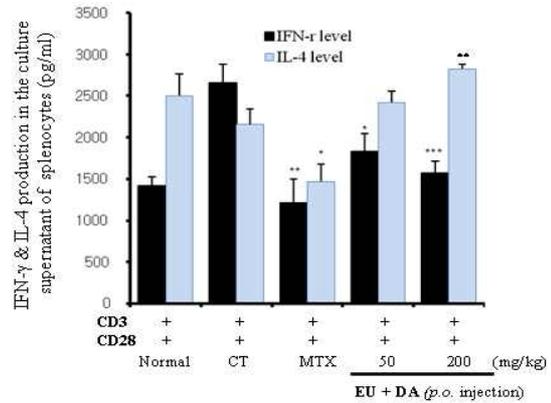


Fig. 9. Effects of EC plus DR on IFN-γ & IL-4 production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated splenocytes

Splenocytes were stimulated with anti- CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 days and the levels of IFN-γ & IL-4 in the culture supernatant were determined by a commercially available ELISA kit (n = 5, * : p < 0.05, *** : p < 0.001).

3. 조직학적 변화

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, EU+DA (200 mg/kg, 50 mg/kg)를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색과 M-T 염색을 통하여 조직을 분석하였다. Fig. 10B는 CIA의 대조군으로 C II에 의한 관절에 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, subsynovial inflammation 그리고 활막세포의 hyperplasia의 침투가 일어나 연골과 뼈의 침하가 진행되었다. 그 외에도 활막의 파괴, 혈관의 확장, cartilage pannus junction 등을 관찰할 수 있다. 반면, MTX 처리군(Fig. 10C), EU+DA 투여군(50 mg/kg)(Fig. 10D), 그리고 EU+DA (200 mg/kg)(Fig. 10E) 투여군에서는 대조군에서 현저하게 관찰된 synovial paw joint cavity (JC)에서의 염증을 관찰할 수 없었고, 또한 관절 주변에서도 역시 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

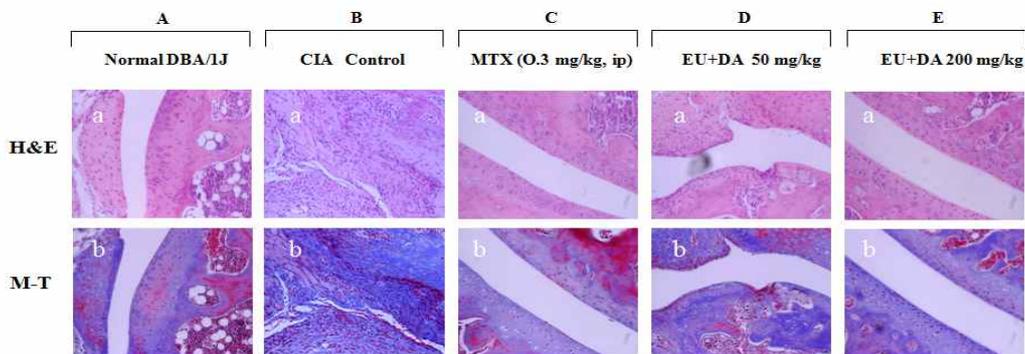


Fig. 10. Histological section of paw joints from CIA mice

DBA/10IaHsd mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin and Meisson Trichrome staining. (A) Normal wild-type DBA/10IaHsd mouse, control, (B) murine CIA, (C) MTX-0.3 mg/kg, (D) EU+DA 50 mg/kg and (E) EU+DA 200 mg/kg were analysis with histopathology of paw joints of murine CIA. Intraarticular exudate, marginalerosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel.

고찰

류마티스 관절염은 IgG의 Fc영역에 있는 결정기와 반응하는 류마티스 인자(Rheumatoid factor)라는 일군의 자가항체를 생산하며, 이들 자가항체는 IgM - IgG 복합체를 형성하여 관절에 침착하고 이 면역복합체는 보체 단단계 반응(complement cascade)을 활성화시켜 관절의 만성 염증으로 이어지는 제3형 과민증을 유도한다¹³⁾. TNF- α 와 IL-1의 분비가 연골손상을 촉진하는 중요한 원인이며¹⁴⁾, 관절염 병리기전의 주요 인자로 알려져 있으며¹⁵⁾ Th1과 Th2의 불균형이 자가면역 발병여부에 영향을 준다.¹⁶⁾ Th1/Th2페어다임은 자가면역 T세포 싸이토카인 생산의 분극화에서 기인한다는 것을 가정한다. CD4T 세포 활동은 인터페론 같은 친염증성 Th1 싸이토카인의 과잉생산과 IL-4와 같은 항염증성 Th2 싸이토카인의 결핍을 통하여 발병기전에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾.

활막에서 분비되는 싸이토카인에 따라, T세포의 반응은 Th1 (IFN- γ) 혹은 Th2 (IL-4와 IL-13)의 반응으로 분류되며, Th1반응은 만성 염증성 자가면역질환으로 함축된다.

류마티스 인자가 있다는 것은 질환의 중증도와 연관성이 있으며, 류마티스 인자가 양성인 환자들은 대부분 관절 외 증상을 많이 나타냈다¹⁸⁾.

골관절염은 국소적인 관절에 점진적인 관절연골의 소실 및 그와 관련된 2차적인 변화와 증상을 동반하는 질환으로 퇴행성 관절염, 퇴행성 관절질환이라고도 불리며 발병기전으로는, 첫째 연골기질(cartilage matrix)의 손상 또는 변화, 둘째 조직의 손상에 대한 연골세포의 반응, 셋째 세포 반응의 감소이다. 이중 두 번째 단계인 이화작용 및 파괴에 관여하는 효소로는 인터루킨1(IL-1)과 종양괴사 인자(TNF- α)가 중요하며 동화작용에 관여하는 인자로는 IL-6, 성장인자, 인슐린, TGF- β 등이 있다. TGF- β 는 관절연골의 단백 다당의 합성을 자극하며 IL-1의 연골파괴 작용을 억제한다¹⁹⁾. 골관절염의 주요 증상은鈍痛, 刺痛, 麻木感, 早朝強直, 운동범위 감소, 관절 주위의 근육 약화, 관절연발음, 관절의 변형 등이 있다.

American College of Rheumatology의 손, 고관절, 무릎에 대한 골관절 분리기준에서 손의 골관절염을 제외하고는 모두 방사선진단을 포함하여²⁰⁾ 구분해 놓았다^{21,22)}.

양방에서는 일차적 항류마티스 약제로 MTX를 많이 사용하며 생물학적 제제로는 TNF 억제제를 활발하게 사용하고 있다²³⁾.

한의학에서 痺病에 대하여는 《黃帝內經·素問·痺論》에서는 痺病의 病因과 분류에 대해 “風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也. 其風氣勝者爲行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲著痺也”²⁴⁾라고 하였으며, 《金匱要略》에서는 “太陽病關節疼痛而煩, 脈沉而細者, 此名濕痺”²⁵⁾라 하여 濕痺와 “血痺, …, 外證身體不仁, 如風痺狀”라 하여 血痺에 대하여도 언급하였고²⁶⁾, 張從正은 《儒門事親》 卷一 指風痺痿厥近

世差互說二에서 “痺病以濕熱爲源, 風寒爲兼, 三氣合而爲痺”라 언급하였다²⁷⁾. 현대 中醫學에서는 痺病의 發生原因을 “有風寒濕三氣襲人而成 ; 有痰濁陰火, 死血瘀滯而成”이라 하고, 肢體肌肉 등의 疼痛, 重着, 麻木, 腫脹, 屈伸不利가 나타나며, 심하면 關節의 變形 또는 聯關臟腑에 特徵의인 一連의 病症이 되는 것을 總稱하는 風濕病이라 하였다²⁸⁾.

杜仲은 風濕性關節炎이 오래되도록 낮지 않아 痿痺에 金剛丸²⁹⁾. 風濕性腰痛을 脚膝疼痛에는 杜仲湯³⁰⁾ 사용한다.

續斷은 風濕으로 인한 肢體疼痛과³¹⁾, 각종 風濕性 關節炎이 오래되어 낮지 않고, 肌肉이 위축되어 단순히 祛風 濕藥만으로 치료가 안 될 경우 補하는 약으로서의 효과가 있다³²⁾.

이에 저자는 杜仲과 續斷이 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여 DBA/10IaHsd 생쥐에 collagen II를 감각하여 관절염을 유도한 후 杜仲과 續斷의 배합 추출물을 경구 투여한 후 항관절염 효과를 관찰하였고, 양성 대조군으로는 MTX를 사용하여 그 효능을 비교하였다.

본 실험에서 CIA 마우스에 EU+DA를 경구 투여하였을 경우, 관절염의 발병 진행이 억제되고 관절염 지수(arthritis index)가 대조군에 비하여 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

B세포의 활성화는 rheumatoid factor (RF)를 합성하는데 중요한 역할을 하며 류마티스 활액막에는 RF특이성과 함께 많은 B세포를 포함하고 있다³³⁾. 본 실험에서는 CD19⁺ B세포 수는 PBMC 내에서 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

또한 NKT세포는 관절염의 병인, 조절, 발병기전에 관여하며 자가면역 관절염증과 관련이 있을 수 있는데³⁴⁾ 본 실험에서도 PBMC에서 대조군에 비하여 NKT (CD3⁺CD49)(%)의 유의성 있는 감소가 관찰되어 부합되는 결과가 도출되었다(Fig. 3).

활성화된 CD4⁺ T세포는 관절 부위의 골 파괴에 있어서 중추적인 역할을 담당하며³⁵⁾, 다른 세포로 하여금 IL-1, IL-6 및 TNF α 와 같은 염증성 싸이토카인을 생성하도록 자극하는 역할을 주도하므로³⁶⁾ 본 실험결과는 EU+DA가 CIA에서 CD4⁺ T세포 반응 억제 효과를 통하여 Th1에서 Th2로 전환 유도와 더불어 Th1 우위의 싸이토카인의 활성을 억제함으로써 Th1 편향의 병리인 RA를 억제할 수 있음을 시사해 주고 있다. EU+DA는 paw joint에서 대조군 비하여 CD3⁺, CD4⁺, CD3⁺/CD69⁺는 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4, 5).

IL-1은 관절염 발생에 있어서 중요한 전염증성 싸이토카인이며 세포의 염증부위 침윤을 높인다³⁶⁾. 몇몇 연구에서 IL-1이 관절 손상에 있어서 중추적인 역할을 하는 것을 확인했다. IL-1의 생성은 주로 실험실과 임상 관절염의 초기 단계에 있어서 증가한다³⁷⁾. 본 연구에서 EU+DA의 투여로 염증성 싸이토카인인 IL-6와 TNF- α 분비를 관찰한 결과 EU+DA를 투여한 CIA 생쥐에서 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 의 분비가 EU+DA 200 mg/kg 농도에

서 유의성있게 감소하였다(Fig. 6).

또한 RA 인자인 IgG은 유의성 없이 감소하였으나 EU+DA 200 mg/kg 농도에서 IgM 생산이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7, 8).

Th1과 Th2 사이토카인의 균형이 깨진 CIA 생쥐에서 Th1 편향인 IFN- γ 의 생산량이 EU+DA를 투여한 후 감소되었고 상대적으로 IL-4의 생산량은 증가됨(Fig. 9)을 확인할 수 있었다.

세포조직학적 관찰을 통하여 EU+DA를 경구 투여한 군의 경우, 염증성 세포들이 대조군에 비하여 현저하게 줄어들고, 관절강이 잘 확보되어 있으며, pannus의 형성이 보이지 않고 연골 또한 잘 보호되어 있음을 확인하였다(Fig. 10).

이러한 효능은 EU+DA가 관절염의 병리 기전에 중요한 역할을 수행하는 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비를 억제하고 또한 TNF- α 및 IL-6 등의 염증성 사이토카인을 분비하게 하는 활성 T 림프구를 억제하여 관절염의 발병을 지연시켜 관절염 지수의 감소를 가져 온 것으로 예측된다.

위와 같이 CIA에서 DC 아집단들의 기능적 역할 및 본 실험에서의 결과를 고찰해 보았는데, 이상의 결과로 보아 EU+DA가 CIA 생쥐 모델에서 PBMC 내와 paw joint에서의 염증성 과립구를 유의성 있게 감소시키며, 혈청 중 TNF- α , IL-6, IgG, IgM, 그리고 IFN- γ 의 생산량을 억제하고, paw joint에서 CD3⁺/CD69⁺를 감소시킨다. 그러므로 EU+DA가 염증사이토카인 등을 억제하고 CD4⁺CD25⁺을 up-regulation하여 CIA 생쥐에서 activated T세포를 감소시키는 것으로 보아, anti-arthritic 효능을 가지고 있는 immunomodulator 역할을 할 수 있을 것으로 생각되며 고농도인 200 mg/kg의 농도에서 효과가 더 크다는 결과를 얻었다.

결론

杜仲과 續斷 배합약물(EU+DA)의 관절염에 대한 억제 효능을 실험적으로 검색하고자, CIA모델 생쥐에 EU+DA를 투여하여, 관절염 유발률, 관절의 조직학적 변화, thymus, paw joint의 총 세포 수에 미치는 영향, 면역 세포에 미치는 영향 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EU+DA 200 mg/kg 및 50 mg/kg의 모든 농도에서 콜라겐으로 유발된 관절염의 arthritis index값이 유의성 있게 감소하였다.
2. EU+DA 200 mg/kg 농도는 대조군에 비하여 생쥐의 혈청내의 전염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.
3. EU+DA 200 mg/kg 농도는 류마티드 인자(RF) 중 IgM을 유의성 있게 감소시켰다.

4. EU+DA 200 mg/kg 농도는 PBMC에서 대조군에 비하여 CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD25⁺는 유의성 있게 증가, CD19⁺, CD3⁺/CD49b⁺ (NKT), CD3⁺/CD49b⁺ (NK), B220⁺/CD23⁺는 유의성 있게 감소시켰다.
5. EU+DA는 paw joint에서 대조군 비하여 CD3⁺, CD4⁺, CD3⁺/CD69⁺는 유의성 있게 감소시켰다.
6. EU+DA는 대조군에 비하여 관절염이 발생한 관절강에서의 염증을 감소시켰으며, 관절 주변에서 면역세포의 침투나 연골의 침하, 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

이상의 결과와 같이 杜仲·續斷 배합약물이 관절염 진행 관절부위에서의 효과가 큰 것으로 나타났으므로 이 배합약물을 관절염에 적용할 수 있는 새로운 가능성이 있을 것으로 여겨진다. 또 향후 이러한 억제효과에 대한 기전을 규명하기 위한 보다 깊은 연구가 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

1. 질병관리본부 만성병조사팀. 2005 건강행태 및 만성질환 통계 자료집. 서울 : 보건복지부. 2006 : 133-4.
2. 보건복지부. 질병관리본부. 국민건강영양조사 제4기 1차년도(2007). 서울 : 질병관리본부. 2008 : 76.
3. 대한정형외과학회. 정형외과. 6판. 서울 : 최신의학사. 2006 : 226.
4. 대한정형외과학회. 정형외과. 6판. 서울 : 최신의학사. 2006 : 229-31.
5. 李今庸 主編. 新編黃帝內經綱目. 上海 : 上海科學技術出版社. 1988 : 262.
6. 한의과대학 본초학편집위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 605.
7. 한방약리학 교재편찬위원회. 약리학. 서울 : 신일상사. 1992 : 421-2.
8. 최도영 외. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 177-96.
9. 임창경. 이묘산의 항류마티즘 효능에 대한 연구. 원광대학교 대학원 한의학과. 2003.
10. 송인광 외. 쥐의 콜라겐 유도 관절염에 대한 유근피의 효과 및 기전. 대한침구학회지. 2007 ; 24(2) : 83-100.
11. 김양진. 콜라겐 유도에 의한 CIA 관절염 생쥐에 대한 백개자의 억제 효과. 상지대학교 대학원 한의학과. 2008.
12. 이승혁 편역. 신편 임상약대론. 서울 : 의성당. 2007 : 292.
13. 강호영 외 공역. 면역학(Thomas J Kindt. et al. Immunology(vol. 6)). 6판. 서울 : 월드사이언스.

- 2008 : 411
14. 김정철 외 공역. 한눈에 알 수 있는 면역학. 8판. 서울 : E pubric. 2006 : 81.
 15. J.M. Dayer et al. Antiinterleukin-1 therapy in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2001 ; 13 : 170-6.
 16. 강호영 외 공역. 면역학(Thomas J Kindt. et al. Immunology.(Vol. 6)). 6판. 서울 : 월드사이언스. 2008 : 414.
 17. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathway and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001 ; 344 : 907-16.
 18. 대한정형외과학회. 정형외과. 6판. 서울 : 최신의학사. 2006 : 234-5.
 19. 대한정형외과학회. 정형외과. 6판. 서울 : 최신의학사. 2006 : 253-8.
 20. Ralph Hinton, Col MC, USA et al. Osteoarthritis: Diagnosis and Therapeutic Consideration. *American Family Physician.* 2002 ; 65(5) : 844.
 21. Altman R et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 1991 ; 34 : 505-14.
 22. Altman R et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986 ; 29 : 1039.
 23. 이연아, 홍승재. 류마티스 관절염의 최신치료 지견. *경희의학.* 2007 ; 23(1) : 9-10.
 24. 郭靄春 主編. 黃帝內經素問校注. 北京 : 人民衛生出版社. 1995 : 555-6.
 25. 李克光 主編. 金匱要略. 台北 : 知音出版社. 1994 : 55.
 26. 李克光 主編. 金匱要略. 台北 : 知音出版社. 1994 : 152.
 27. 陳夢雷 等 編. 古今圖書集成 醫部全錄(第六冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1988 : 194.
 28. 婁玉鈴. 中國風濕病學. 北京 : 人民衛生出版社. 2001 : 60-3.
 29. 陳存仁. 圖說 漢方醫藥大事典. 第3卷. 東京 : 講談社. 1982 : 192.
 30. 강병수, 이장천 외. 원색 한약보감. 대구 : 동아문화사. 2008 : 214.
 31. 강병수, 이장천 외. 원색 한약보감. 대구 : 동아문화사. 2008 : 482.
 32. 陳存仁. 圖說 漢方醫藥大事典 第3卷. 東京 : 講談社. 1982 : 378.
 33. William N Kelly et al Rheumatoid factors. in Tighe, H and Carson D.A. *Textbook of Rheumatology.* Ontario : Saunders. 1997 : 241-9.
 34. Coppieters K, Dewint P, Van Beneden K et al. NKT cells : manipulable managers of joint inflammation. *Rheumatology.* 2007 ; 46 : 565-71.
 35. Kong YY et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999 ; 402 : 304-9.
 36. Mori L et al Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol.* 1996 ; 157 : 3178-82.
 37. Guo-Min Deng, Michael Lenardo. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drug discovery Today : Disease Mechanism.* 2006 ; 3(2) : 163-8.