

陳皮 에탄올추출물의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 항관절염 효과 연구

정진기¹, 손건호², 김영식³, 박용기^{1,*}

1: 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2: 안동대학교 생활과학대학 식품영양학과,
3: 서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice

JinKi Jung¹, Kun Ho Son², Young Shik Kim³, Yong-Ki Park^{1,*}

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 740-814, South Korea,
2: Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, South Korea,
3: Natural Products Research Institute and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, South Korea,

ABSTRACT

Objectives : The present study was undertaken to determine whether an ethanol extract of Citri Pericarpium (CP-E), which is the pericarp of *Citrus unshiu* Markovich is efficacious against collagen-induced arthritis (CIA) in mice.

Methods : CIA was induced in male DBA/1J mice by intradermal injection of bovine collagen-II in Freund's incomplete adjuvant (IFA). The mice in the onset of arthritis were treated daily with oral administration of CP-E ethanol extract at different doses (50 and 100 mg/kg/bw) for 28 days. Arthritis index, histopathologic changes and the levels of TNF- α as well as anti-CII IgG in blood were evaluated to confirm the anti-arthritic effect of CP-E on CIA in rats.

Results : The results showed that comparing with untreated CIA mice, treated with CP-E extract significantly decreased the arthritic scores and the pathological changes of knee joint tissues, and also reduced the serum levels of TNF- α and anti-CII IgG in CIA-mice. These results indicate that CP-E extract may effectively alleviate inflammatory response on CIA, and its anti-inflammation can be attributed, at least partially, to the inhibition of proinflammatory cytokine, TNF- α in CIA.

Conclusions : This study suggest that CP-E has a therapeutic potential in inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis.

Key words : Citri Pericarpium, anti-arthritis, collagen-induced arthritis, inflammation

서론

류마티스 관절염은 자가면역질환의 일종으로 관절 활액막(synovium)에 만성적으로 비대 및 염증반응이 일어남으로써 연골과 골 파괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 특징으로 하는 만성 염증성 질환이다¹⁾. 류마티스 관절염은 유전적 및 환경적인 원인에 의해 유발되지만, 최근 보고에 따르면 세포매개성 면역반응에서 협력 및 유도 역할을 하는 CD4 T 세포 중

Th1 세포가 Th2 세포보다 과도하게 편향되어 분화되고 활성화됨으로써 Th1 cytokine이 Th2 cytokine 보다 많이 생성되어 유발되는 것으로 보고되고 있다^{2,3,4)}. 류마티스 관절염은 현재 완치시키거나 예방할 수 있는 방법은 없으며, 조기 진단을 통해 적절한 치료를 함으로써 비가역적 손상을 막아주고, 활막 염증으로 인한 관절의 변형과 파괴로 관절 기능의 영구적인 손실을 막고 장기 손상을 예방하기 위한 약물요법이 주로 사용되고 있다. 주요 약물요법으로는 발병 초기 선택적 COX-2

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학.
· Tel : 054-770-2661, · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.
· 접수 : 2011년 8월 15일 · 수정 : 2011년 9월 3일 · 채택 : 2011년 9월 17일

길항제, salicylate 등과 같은 비스테로이드성 소염진통제를 사용하거나 methotrexate, sulfasalazine, auranofin 등과 같은 항류마티스제제(DMARDs)를 투여하게 되며, 증상 및 질병 활성도가 조절되지 않는 경우 TNF- α 길항제, IL-1, IL-6 수용체 길항제 등의 생물학적 제제를 사용하거나 병용하고 있다⁵⁻⁷⁾.

최근 류마티스 관절염에 대한 면역학적 접근방법이 많이 시도되고 있고 병인에 대한 분자생물학적 이해가 깊어지면서 새로운 약물과 치료법이 개발되고 있지만 약물투여를 지속적으로 하지 않으면 다시 활성화되거나, 장기복용에 따른 부작용, 실제 임상에서의 미비한 효과 등의 문제로 치료제 개발이 반드시 필요한 질환이다.

한의학에서 류마티스 관절염은 痺證의 범주의 속하는데⁸⁾, 痺란 기혈순행이 不通하거나 근맥관절의 濡養이 失調되었을 때, 風寒濕熱의 邪氣에 感受하여 발생하며 肢體, 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障礙等を 主要症狀으로 하는 하나의 病證이다⁹⁾.

陳皮(Citri Pericarpium)는 운향과(Rutaceae)에 속한 常綠 小喬木인 귤나무(*Citrus unshiu* Markovich) 및 同屬 近緣植物의 성숙한 果實의 果皮로 11월에 채취하여 曬乾하여 사용한다¹⁰⁾. 陳皮에 대하여 東醫寶鑑¹¹⁾에는 '가슴에 기가 멎진 것을 풀리게 하고, 입맛을 당기게 하며, 소화를 잘 시키고, 이질을 멎게 해준다. 구역질을 그치게 하며, 대소변을 잘 보게 한다. 또한 가래를 삭히고 기침을 낫게 한다' 는 효능이 알려져 있다. 또한 陳皮는 flavonoid, alkaloid, lignin, monoterpenoid, sesquiterpenoid, triterpenoid 등 다양한 성분을 함유하고 있으며, 실험연구로 진피 에탄올 추출물의 Alloxan 유도 HIT-T15 세포에서의 산화적 손상에 대한 억제효과¹²⁾, 진피 발효추출물의 항산화 효과 및 효소 활성 증가 효과¹³⁾, 제주산 감귤류 진피와 과피의 항산화 활성¹⁴⁾, 진피 및 청피의 마우스에서의 면역세포 조절효과¹⁵⁾ 등이 보고되었으며, 陳皮의 관절염 예방 및 개선 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 陳皮의 관절염에 대한 효과를 확인하기 위해 진피의 에탄올추출물을 제조하여 콜라겐 유입에 의해 관절염이 유발된 마우스(collagen-induced arthritis; CIA mice)에서의 항관절염 효과를 조사하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 陳皮(*Citrus unshiu* Markovich, Citri Pericarpium; CP)는 2010년 10월 식약청 한약재과학화사업단의 안동대학교 손건호교수로부터 시료를 제공받아 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 7~8주령의 DBA/1J계 수컷 마우스(mouse, 20~25 g)를 (주)오리엔트바이오(경기도, 한국)으로부터 구입하였다. 모든 실험동물은 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였으며, 일정한 온도(23±3℃)와 습도(50±10%) 및 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하여 사육하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약은 collagen(type II, Sigma-Aldrich, St Louse, CA, USA), Complete Freund's adjuvant(Sigma-Aldrich), H&E stain kit(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), Collagen Type II Antibody ELISA kit(MD Bioproduct, Division of MD Biosciences Inc., St Paul, MN, USA), DuoSet mTNF- α ELISA Development System(R&D System, Inc., MN, USA) 등을 사용하였다.

실험에 사용되어진 기기로는 Microplate Reader(Asys, Sunnyvale, CA, USA), Rotary Evaporator(Eyela, Japan), Orbital Shaker(Finemould Precision IN, Co., Gyenggi-do, Korea), Microscopy(Olympus Imaging America Inc., Center Valley, PA 18034-0610, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 陳皮 에탄올추출물의 제조

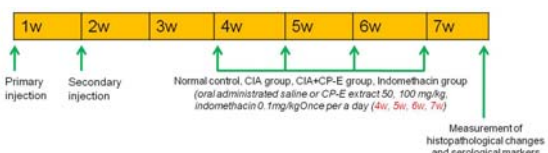
陳皮(CP) 16.05 kg을 70% 에탄올 70L와 함께 5시간 씩 3회 추출한 후 3겹 거여즈와 와트만여과지(Wathman No. 1)로 여과하여 진공회전증발농축기(rotary vacuum evaporator)에서 감압 농축한 다음 동결 건조하였으며 이때 진피 에탄올추출물의 총 회수량은 7173.55 g이었다. 陳皮 에탄올추출물(CP-E, Voucher No. NCSHM 2011-CP)은 냉장 보관하면서 실험 전 멸균된 생리식염수에 완전히 용해한 후 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 실험약물로 사용하였으며 남은 시료는 냉동보관(-20℃) 하였습니다.

2) 콜라겐 유도 관절염 동물 제작

콜라겐에 의한 관절염 유발(collagen-induced arthritis; CIA)은 먼저 0.01 N acetic acid에 제2형 콜라겐(bovine type II collagen) 2 mg/ml을 4℃에서 하룻밤 녹인 후 동량(w/v)의 Freund's complete adjuvant(Chondrex, SA, USA)와 잘 혼합하여 0.1ml을 마우스의 둔부(꼬리가 몸체로 이어지는 부위)에 피하주사(intradermal)하였다. 또한 14일 후 동일 방법으로 제조된 콜라겐 용액에 Freund's incomplete adjuvant를 동량으로 혼합하여 마우스의 뒷다리 족근골에 피하 주사함으로써 관절염을 유발하였다(Fig. 1).

실험군은 마우스 10마리를 한 군으로 하여 관절염을 유발시키지 않은 정상 대조군(normal control), 관절염을 유발시킨 대조군(CIA control) 및 陳皮 에탄올추출물을 투여한 약물군(CIA+CP-E) 및 대조약물로 비선택적 COX-2 억제제이며 항관절염 약물인 indomethacin을 투여한 약물 대조군(CIA+Indomethacin)으로 나누었다.

약물의 투여는 陳皮 에탄올추출물 50, 100 mg/kg/body weight 또는 indomethacin 1 mg/kg/body weight를 CIA 유발 후 28일부터 48일까지 28일 동안 매일 1회, 정해진 시간에 경구 투여하였으며, 49일에 모든 실험동물을 희생시켜 관절염 개선 정도를 평가하였다.



Scheme. 1. Experimental scheme in collagen-induced arthritis mouse model

3) 관절염 평가

발 관절염은 28일부터 48일까지 매주 1회 관찰하였으며, 관절염 정도(clinical severity)를 William 등²²⁾에 의한 관절염 육안평가방법(rheumatoid scoring system)을 이용하여 평가하였다. 즉, 부종이나 발적, 종창 등 관절염의 증거가 없는 경우 0 (normal), 한 두 개의 발가락 종창을 동반한 홍조를 띄거나 최소한의 종창이 유발된 상태로 족근골이나 발목 관절에 국한된 경한 부종과 발적이 있는 경우 1점(slight swelling and/or erythema of the fingers), 확실한 홍조를 띄거나 국부적 상지 종창, 그리고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태, 발목 관절에서 족근골에 걸친 중증도의 부종과 발적이 있는 경우 2점(pronounced edematous swelling), 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 발목에서 발가락 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우 3점(joint rigidity with edematous swelling or joint ankylosis)으로 하여 점수를 측정하였다. 1점과 2점은 주로 가역성(reversible)의 부종성 염증(edematous inflammation)을 동반하며, 3점은 비가역성(irreversible)의 이미 관절염이 진행된 관절 강직(joint ankylosis)을 나타낸다. 관절염의 평가는 실험군과 대조군에 대해 알고 있지 않은 두 명의 관찰자가 참여하여 관찰자에 따른 오차를 최소화하였다.

4) 혈액수집과 혈청 분리

실험 49일째 모든 실험동물을 이소플로란(isoflurane)로 마취시킨 후 심장천자에서 혈액을 수집하였으며, 6,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70°C에 보관하면서 차후 혈액학적 검사를 위해 사용하였다.

5) 혈액학적 검사

(1) 항콜라겐 항체 측정

혈청 내 항콜라겐 항체의 함량은 ELISA 방법으로 anti-C II IgG ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 96 well polystyrene microplate(Nunc, Denmark)의 각 well에 0.1M PBS에 녹인 chicken type II collagen(10 µg/ml)을 가하여 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 0.05% Tween-20 이 포함된 1× PBS(PBS-T)로 4회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 각 well에 0.5% ovalbumin이 포함된 1× PBS를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-T로 4회 세척하였다. 마우스의 혈청은 1× PBS로 희석(1:100)하여 각 well에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 그 후 각 well에 peroxidase-conjugated antimouse IgG를 넣어 2시간 동안 반응시킨 후 5-aminosalicylic acid를 넣어 반응을 종료시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항collagen 항체 측정치는 3회 시행하여 평균값을 얻었으며, 여기에서 얻은 흡광도를 anti-C II IgG의 표준농도곡선에 대입하여 혈청 내 농도를 계산하였다.

(2) TNF-α 측정

혈청 내 TNF-α의 양은 ELISA 방법으로 TNF-α ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 mouse TNF-α 항체가 도포된 96-well polystyrene microplate의 각 well에 표준 농도의 mouse TNF-α를 넣고 동시에 마우스 혈청을 넣었다. 이 plate를 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 여기에 HRP-conjugated anti-mouse TNF-α를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 여기에 다시 substrate chromogen solution을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1 M H₂SO₄를 넣어

반응을 중지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α의 측정치는 3회 시행하여 평균값을 얻었으며, 여기에서 얻은 흡광도를 통해 TNF-α의 표준농도곡선에 대입하여 혈청 내 TNF-α의 농도를 계산하였다.

6) 조직표본 제작 및 염색

실험 49일째 모든 실험동물을 희생시킨 후 우측 족근관절이 포함되도록 경골 원위부에서 중족골(metatarsal) 원위부(distal) 사이를 적출하고 10% 중성 포르말린용액(formaldehyde)에 4°C에서 24시간 고정한 후 20% formic acid에 3일간 침지하여 탈회하였다. 탈회된 조직을 24시간 수세하여 조직 내 남아있는 포르말린을 제거한 후, 50% 알코올에서부터 무수알코올까지 농도 상승순으로 탈수하고 자일렌(xylene)으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 파라핀 블록을 제작하였으며 회전형 박질기(microtome)를 사용하여 5 µm두께로 자른 뒤 슬라이드 위에 놓아 조직표본을 제작하였다.

제작한 파라핀 조직표본은 xylene, 무수알코올, 50% 알코올 순으로 탈 파라핀 과정을 거친 후 Hematoxylin & eosin(H&E) 염색시약으로 염색하여 광학현미경 하에 관절조직의 형태변화를 관찰하였다.

7) 통계학적 검증

결과는 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램의 one-way ANOVA, Tukey's test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 관절염 발병도 변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 나타나는 관절염의 발병도(clinical severity)에 대한 陳皮 에탄올추출물의 효과를 확인하기 위해 콜라겐 주입 후 28일부터 48일까지 매주 1회 관절염 지수(arthritis score)를 측정하였다.

그 결과, CIA 대조군에서는 실험 28일부터 42일까지 관절염의 지수가 시간에 의존적으로 증가하였으나, 陳皮 에탄올추출물(CP-E)을 50, 100 mg/kg 농도로 경구 투여한 약물군은 CIA 대조군에 비해 감소되는 경향은 보였다(Fig. 1). 또한 양성대조약물인 Indomethacin 투여군에서도 CIA 대조군에 비해 유의적으로 관절염 지수가 감소되었다.

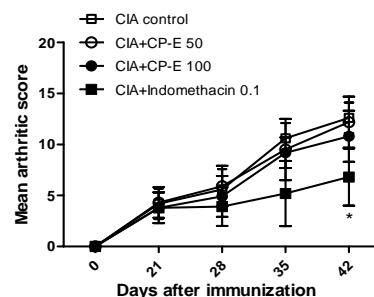


Fig. 1. Effects of Citri Pericarpium ethanol extract on progression of established CIA in DBA/1J mice. Mice were treated with Citri Pericarpium ethanol extract(CP-E) or indomethacin once daily from 28 to 48 days after immunization. Results are expressed mean ± SD (n=10). *p<0.05 vs. CIA group.

2. 항콜라겐 항체에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 나타나는 콜라겐 항원에 대한 특이적 항체인 항콜라겐 항체에 대한 陳皮 에탄올추출물의 효과를 조사하기 위해서 ELISA 방법으로 혈청 내 anti-CII IgG의 양을 측정하였다.

그 결과, 정상대조군에서는 5.59 ± 1.28 units/ml, CIA 대조군에서는 51.58 ± 0.88 units/ml, 陳皮 에탄올추출물(CP-E)을 50과 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각 40.02 ± 0.17 units/ml, 40.04 ± 0.16 units/ml로 陳皮 에탄올추출물 투여군은 대조군에 비하여 모두 유의적으로 감소하였다(Fig. 2). 또한 indomethacin을 투여한 군에서도 48.33 ± 6.14 units/ml로 대조군에 비하여 감소는 하였다.

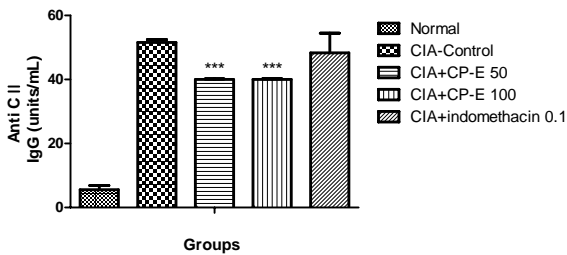


Fig. 2. Effects of Citri Pericarpium ethanol extract on anti-type II collagen IgG in sera of mice. Mice were treated with Citri Pericarpium ethanol extract(CP-E) or indomethacin once daily from 28 to 48 days after immunization. Results are expressed mean \pm SD (n=10). *** p (0.001 vs. CIA group).

3. TNF- α 에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 다량 생성되는 염증사이토카인인 TNF- α 에 대한 陳皮 에탄올추출물의 효과를 조사하기 위해서 ELISA 방법으로 혈청 내 TNF- α 의 양을 측정하였다.

그 결과, 정상대조군에서는 8.02 ± 0.80 pg/ml, CIA 대조군에서는 56.37 ± 4.03 pg/ml, 陳皮 에탄올추출물(CP-E)을 50과 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각 44.26 ± 5.44 pg/

ml, 41.09 ± 6.64 pg/ml로 陳皮 에탄올추출물 50, 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 TNF- α 가 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 또한 indomethacin을 투여한 군에서도 35.96 ± 5.38 pg/ml로 대조군에 비하여 역시 유의적인 감소를 나타내었다.

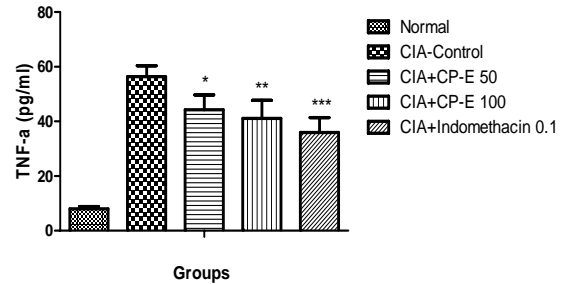


Fig. 3. Effects of Citri Pericarpium ethanol extract on TNF- α in sera of DBA/1J mice. Mice were treated with Citri Pericarpium ethanol extract (CP-E) or indomethacin once daily from 28 to 48 days after immunization. Results are expressed mean \pm SD (n=10). * p (0.05, ** p (0.01 and *** p (0.001 vs. CIA group).

5. 관절조직의 형태변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 류마티스 관절염이 유발된 마우스에서 나타나는 족근관절의 손상에 대한 陳皮 에탄올추출물의 효과를 조사하기 위해서 관절조직을 H&E 염색하였다.

먼저, 마우스의 족근관절의 형태변화를 관찰한 결과, 대조군(CIA)에서는 특이적으로 관절 주위의 부종과 다형 백혈구, 림프구 등의 침윤이 현저하게 관찰되었으며 활막의 염증(synovial inflammation), 비후와 더불어 현저한 관절면의 연골손실(bone erosion)을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이에 반하여 陳皮 에탄올추출물(CP-E)을 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여한 군에서는 대조군에 비해서 염증세포의 침윤과 활막의 비후가 억제되었으며, 관절면의 연골 손실이 줄어들었고, 골 파괴가 개선되었으며 염증세포의 침윤과 활막의 비후가 억제 되는 것이 관찰되었다.

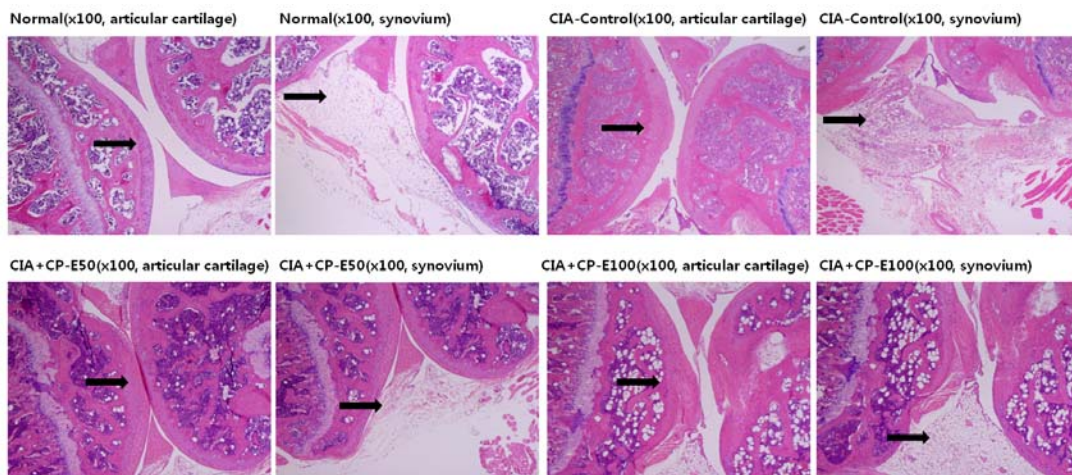


Fig. 4. Effects of Citri Pericarpium ethanol extract on histological features of representative ankle joint from DBA/1J mice by H&E staining. Mice were treated with Citri Pericarpium ethanol water(CP-E) or indomethacin once daily from 28 to 48 days after immunization.

고찰

류마티스 관절염은 관절활막에 발생하는 만성 염증으로 유발되는 자가면역질환의 일종이다¹⁾. 여러 관절에, 주로 손, 무릎 관절에 대칭적으로 염증을 일으켜 수년 혹은 수십 년에 걸쳐 관절이 서서히 파괴되며, 때로는 관절뿐만 아니라 폐, 심장, 눈 등의 여러 장기에 침범하기도 한다. 우리나라 인구의 1~2%가 류마티스 관절염 질환을 가지고 있으며, 주로 30~50대의 여성에게 발병되며, 발병율은 연령에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다^{16,17)}. 류마티스 관절염에 의한 관절 침범은 전신의 모든 관절에 적용되나, 특징적으로 손과 발의 관절, 특히 근위시간관절과 중수(족)지 관절에서 비세균성 만성염증반응이 장기간 나타나면서 관절통이나 종창이 악화하고 호전을 반복하며, 초기에는 활액막이 증식하고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하게 되며, 만성적인 경과를 밟게 되는데 치료를 하지 않을 경우 염증으로 인한 관절의 변형과 파괴로 관절 기능의 영구적 손실을 가져오기 때문에 조기 진단과 단계에 맞는 적절한 치료가 필수적이다^{5,6)}.

한의학에서 류마티스 관절염을 주로 痺症과 關節風으로 표현하며, 痺는 저리며 순환이 안 된다는 의미이고, 關節風은 관절이 붓고 마디마디에 심한 통증을 나타낸다는 의미로 순환 장애로 인해 관절에 통증을 나타내는 질환으로 단순한 관절의 염증이 아니라 전신 질환으로 보고 있다. 또한 黃辛內經에서 痺症의 의미는 기본적으로 閉塞不通이며, 廣義로는 臟腑, 器官, 組織의 氣機가 적체되어 발생하는 증상이고, 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 순환을 방해하고 經路의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 불편한 症狀을 의미한다^{8,9,18)}.

陳皮는 理氣藥으로 理氣建脾, 燥濕化痰하는 작용이 있다고 보고되어 있으며 최근 진피 추출물이 항산화효과¹²⁻¹⁴⁾, 면역조절효과¹⁵⁾ 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 陳皮의 에탄올추출물의 류마티스 관절염 동물모델인 콜라겐 유도 관절염(CIA) 마우스에서의 관절조직 손상과 관절활막 염증반응에 대한 억제 효과를 확인함으로써 陳皮 에탄올추출물의 관절염 개선 효과를 확인하였다. 관절염 실험모델 중 콜라겐 유도 관절염(CIA) 마우스 모델은 가장 일반적으로 사용되는 대표적인 자가 면역성 관절염 모델로서 제2형 콜라겐(type II collagen)을 주입함으로써 자가면역성이 유도되는 관절염 연구에 널리 이용되고 있는 류마티스 관절염 모델이다¹⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 陳皮 에탄올추출물의 항류마티스 관절염 효과를 확인하기 위해 DBA/1J 마우스모델을 제작하여 사용하였다.

류마티스 관절염의 관절활막에는 항체를 만드는 B 세포와 형질세포들이 많이 존재하며 콜라겐을 항원으로 주입한 마우스는 병리적 역할을 하는 자가항체인 항콜라겐 항체를 생산하게 되며 이러한 항체는 관절 연골의 주요 구성요소인 콜라겐을 지속적으로 공격함으로써 관절을 파괴하게 된다²⁰⁾. 본 연구에서 陳皮 에탄올추출물은 CIA 마우스의 혈청 내 항콜라겐 항체의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 陳皮가 류마티스 관절염 발달 시 자가항체 생산 반응을 조절함으로써 질환의 발달을 막을 수 있음을 의미한다.

류마티스 관절염은 활막 내 염증 뿐 아니라 골 파괴를 특징으로 하는 질환으로 골 파괴로 인한 관절의 변형이 환자들에게 불편함을 주기 때문에 중요한 치료 목표 중 하나가 뼈를

보호하여 관절의 기능을 유지하게 하는 것인데, 일반적으로 H&E 염색은 관절의 형태변화를 관찰할 수 있는 방법이다. 류마티스 관절염은 병이 진행됨에 따라 염증이 심해져서 연부 조직의 종창, 관절 주위 골밀도의 감소, 관절강 협착, 골미란, 관절경화 등의 증상을 나타내게 된다^{21,22)}. 본 연구의 관절조직 H&E 염색에서 陳皮 에탄올추출물은 CIA 마우스의 죽근 관절 주위의 부종과 다형 백혈구, 림프구 등의 침윤을 막고 활막의 염증과 비후를 억제하였으며, 관절면의 연골손실을 줄임으로써 관절염을 개선시키는 효과를 나타내었다.

류마티스 관절염에서의 자가 면역반응은 Th1 면역세포에 의해 조절되는데 관절 활막염 조직에 침윤되는 T 세포는 CD4⁺ Th1 세포이며 주로 IFN- γ 와 같은 Th1 type 사이토카인을 분비하기 때문에 Th1 세포가 자가 면역반응을 조절하고 있을 것으로 보고 있다²³⁾. Th1 세포들은 단핵구·대식세포, 활막세포를 활성화시킴으로써 이들로부터 IL-1, IL-6, TNF- α 와 같은 염증사이토카인의 분비를 촉진하게 되며, B 세포를 자극하여 류마티스 인자(rheumatoid factor), 항콜라겐 항체와 같은 자가항체의 생산을 유도하며, 파골세포의 분화를 유도하여 국소적인 골 파괴를 촉진하기도 한다^{24,25)}. 본 연구에서 陳皮 에탄올추출물은 CIA 마우스의 혈청 내 주요 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성을 유의적으로 감소시켰으며 이는 陳皮 에탄올추출물이 관절염의 염증반응을 유발하는 TNF- α 의 생성을 억제함으로써 활막염의 발생과 진행을 막을 수 있음을 의미한다. TNF- α 는 관절활막세포로부터 분비되는 염증사이토카인으로서 다양한 실험을 통해 관절염 환자의 관절 활막조직에서 TNF- α 의 유전자와 단백질 발현이 보고되고 있어 류마티스 관절염 병인기전에 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 인식되고 있으며, 최근 류마티스 관절염 치료를 위한 생물학적 제제로 TNF- α 길항제가 다양하게 개발되고 있고 현재 가장 많이 사용되고 있다^{26,37)}.

결론적으로 본 연구에서 陳皮 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 항콜라겐 항체 생성을 억제하고, 관절조직의 파괴와 손상을 줄이며, 관절 활막 내 염증반응을 유발하는 TNF- α 의 분비를 억제함으로써 항관절염 효과가 있음을 확인하였다. 이는 陳皮 에탄올추출물이 각종 관절 염증질환의 예방 및 치료제 개발에 도움이 될 수 있음을 시사한다.

결론

본 연구에서는 陳皮 에탄올추출물의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 항관절염 효과를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 陳皮 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 관절염 지수를 시간에 의존하여 감소시키는 경향을 나타냈다.
2. 陳皮 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스의 혈청 내 항콜라겐 항체와 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성을 유의적으로 감소시켰다.
3. 陳皮 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스의 관절조직 형태변형과 활막의 비후를 억제함으로써 관절조직을 보

호하는 것으로 나타났다.

따라서 陳皮 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 항관절염 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 진피가 사람의 관절염 개선에 도움을 될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 한약재평가기술과학화사업(2011년)의 연구비지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. In : Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, eds. *Harrison's principles of internal medicine*, 16th ed. New York : Mc Graw Hill, 2005 : 1968-77.
- Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Pae HO, Chung HT, Yun YG, Jeong OS, Kim YC. Kagambjungikgitang inhibits LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *Korean Journal of Oriental medical Pathology*, 2003 ; 17(3) : 804-9.
- Bonney RC. Treating autoimmune diseases : The market potential for new therapeutic options. PJPB Publication, 2001 : 1-244.
- Veihelmann A, Hofbauer A, Krombach F, Dorger M, Maier M, Refior HJ, Messmer K. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology*, 2002 ; 41 : 509-17.
- The Korean Orthopaedic Association. *orthopedics*, 5th ed. seoul : cholsin medicine publisher, 2000 : 109-31, 157-74, 176.
- The Korean Society of Pathologists. *Pathology*. seoul : komoonsa, 1997 : 85, 1166-70, 1672.
- The whole country a college of Oriental medicine rehabilitation medical science classroom. *Oriental medicine rehabilitation medical science*. seoul : seowondang, 1995 : 95-6.
- Shanghai China medicine Book. *Internal medicine (the first)*. Shanghai : Shanghai science technology publisher, 1983 : 234-38.
- Chung SH. The Study on classification and treatment of Arthralgia Syndrome. *The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine*, 1991 ; 2(1) : 56-66.
- The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation. *Herbalogy*. seoul : younglimsa, 2007 : 389-91.
- Huh J, Tonguibogam. seoul : Hyesungsa, 1994.
- Jung HK, Jeong YS, Park CD, Park CH, Hong JH. Effect of the Ethanol Extract from Citrus Peels on Oxidative Damage in Alloxan-induced HIT-T15 Cell. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39 ; 8 : 1102-6.
- Park SY, Yoo HN, Im JM, Kwon HJ, Cho YS, Choi YH, Kim EM, Kim TY. Effect of the Fermentation extract from Citrus Peels on antioxidant and enzyme activity. *The Korean Society of Food Preservation*, 2010 : 307
- Hyon JS, Kang SM, Mahinda S, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. Antioxidative Activities of Dried and Fresh Citrus Peels in Jeju. *Korean Journal of Food & Cookery Science*, 26 ; 1 : 88-94.
- Eun JS, Yum JY. Effect of Aurantii nobilis Pericarpium and Aurantii immaturi Pericarpium on Immunocytes in Mice. *Kor. J. Pharmacogn*, 29 ; 3 : 173-8.
- Song YW. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*, 2009 ; 76(1) : 1-6.
- Park SH. New diagnostic method of rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*, 2009 ; 76(1) : 7-11.
- Lee JD. Korean Medicine approach to rheumatoid arthritis. *J Kyung Hee Univ Med Cent*, 2004 ; 20(1) : 4-9.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 1977 ; 146 : 857-68.
- Lee J. B cells and autoantibody in RA pathogenesis. *Hanyang Medical reviews*, 2005 ; 25(2) : 21-5.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis : 2002 Update. *Arthritis Rheum*, 2002 ; 46 : 328-46.
- O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2004 ; 350 : 2591-602.
- Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. Molecular targets of rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008 ; 7 : 53-66.
- Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets : advances and limitations. *Immunity*, 2008 ; 28 : 440-4.
- Ji JD. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Hanyang Medical reviews*, 2005 ; 25(2) : 43-52.
- Seo YI. New drugs for rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*, 2009 ; 76(1) : 12-7.
- Cole P, Rabasseda X. The soluble tumor necrosis factor receptor etanercept : a new strategy for the treatment of autoimmune rheumatic disease. *Drugs Today (Barc)*, 2004 ; 40 : 281-324.