

Collagen II-induced Arthritis 생쥐에 대한 吳茱萸, 木瓜 및 배합약물의 관절염 억제 효과

박대중^{1#}, 이영철¹, 이장천^{2*}

1 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부

Inhibitory Effect of a decoction composed of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. and *Chaenomeles sinensis* Koehne and its component herbal medicines on Collagen II-induced Arthritis Mice

Dae-Jung Park^{1#}, Young-Cheol Lee¹, Jang-Cheon Lee^{2*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Sangji University Wonju 220-702, Republic of Korea
2 : Division of Pharmacology and Basic Korean Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University,
Pusan 609-735, South Korea

ABSTRACT

Objectives : *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.(ER) and *Chaenomeles sinensis* Koehne (CS) have multiple applications and were known to have anti-inflammatory effects. In the current study, we investigated to clearly understand the mechanism of therapeutic role for CS, ER and their combination in CIA model mice.

Methods : DBA/10IaHsd mice were immunized with bovine type II collagen. After a second collagen immunization, mice were treated with CS, ER and their combination once a day for 7 weeks. Cytokine production and gene expression were assessed during CIA (collagen-induced arthritis) model mice in knee joint, lymph node (LN) using ELISA and FACS analysis. The severity of arthritis within the knee joints was evaluated by histological assessment of cartilage destruction and pannus formation.

Result : Oral administration of CS, ER and their combination (150 mg/kg) significantly suppressed the progression of CIA, and significantly suppressed the progression of CIA and inhibited the production of TNF- α and IL-6 in serum. The erosion of cartilage was dramatically reduced in mouse knees after treatment with CS plus ER.

Conclusion : These result suggest that CS plus ER significantly suppressed the progression of CIA and that this action was characterized by the decreased production of TNF- α , IL-6 and collagen II specific antibody in serum.

Key words : *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth., *Chaenomeles sinensis* Koehne, CIA, TNF- α , IL-6

서론

류마티스성 관절염은 관절의 활막에 발생하는 만성, 전신성, 염증성 질환으로 현재까지는 정확한 원인이 밝혀지지 않았으며, 조조강직, 대칭적 관절침범, 손 관절을 잘 침범하는 등의 특징이 있다¹⁾. 일반적으로 말초 관절부터 시작해 점점

근위관절로 진행하게 된다. 염증이 잘 조절되지 않은 경우에는 계속 자라는 활성화된 활막조직에 의해 주위의 연골과 뼈가 파괴되어 관절의 변형이 초래된다^{2,3)}.

한의학에서의 관절염은 痺證의 범주에 속하며 歷節風, 痛風, 白虎歷節風 등으로 표현되며 원인으로는 內因과 外因 및 內外가 相合하여 발생한다⁴⁾. 痺病의 의미는 기본적으로 "閉塞

*교신저자 : 이장천, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· Tel : 051-510-8459 · E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr

#제1저자 : 박대중, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학

· Tel : 031-283-7512 · E-mail : inborn5124@hanmail.net

· 접수 : 2014년 6월 10일 · 수정 : 2014년 7월 15일 · 채택 : 2014년 7월 16일

不通"의 뜻을 가지고 있으며, 廣義로는 일체 臟腑·器官·組織의 氣機가 阻滯되어 발생하는 것을 의미하고, 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 運行을 방해하고 經絡의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 부자연스러운 증상을 뜻한다⁵⁾.

吳茱萸는 辛開苦降하고 下焦에 작용하는 厥陰肝經의 主藥으로 溫經散寒, 疏肝解鬱, 行氣止痛한다. 木瓜는 味가 酸하고 木의 正氣를 제일 많이 得하여 肝經에 작용하며, 和胃化濕, 舒筋活絡한다. 吳茱萸는 주로 散하며 木瓜는 주로 收斂한다. 따라서 두 약을 배합하면 一散一收, 相互制約, 相互作用으로 和胃化濕, 舒筋活絡, 溫中止痛의 효과가 좋아진다⁶⁾.

吳茱萸, 木瓜에 대한 최근 연구로서 윤 등⁷⁾의 吳茱萸 메탄올 추출물의 항염증 효과, Shin 등⁸⁾의 吳茱萸 추출물 및 구성 성분의 항알러지 효과, Yu 등⁹⁾의 吳茱萸 물추출물의 위보호 효과, Ko 등¹⁰⁾의 吳茱萸 에탄올 추출물의 항염작용등이 있다. 또한 Gao 등¹¹⁾이 木瓜의 항암효과, Oku 등¹²⁾은 木瓜의 소양증 억제효과, 유 등¹³⁾은 木瓜의 항응혈 효과가 있음을 증명하였으나, 吳茱萸, 木瓜 또는 두 배합약물의 관절염 치료 효과에 대한 보고가 없는 실정이다.

이에 저자는 현대의 관절염에 부합하는 한의학적 痺證에 임상적으로 다양하게 활용되고 있는 吳茱萸와 木瓜 배합 약물의 관절염에 대한 효과를 알아보고자 DBA/10IaHsd 생쥐에 Collagen II를 감작시켜 관절염을 유도한 후 吳茱萸, 木瓜 배합 전탕액을 투여하여 항관절염 효과를 관찰해본 결과, 吳茱萸, 木瓜의 배합약물이 관절염 치료효과에 미치는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 폴라스인터내셔널 (서울, 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 木瓜 (*Chaenomeles sinensis* Koehne: CS), 吳茱萸 (*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. : ER)는 상지대학교 부속한방병원에서 제공받아 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 (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS), 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma 사 (U.S.A.) 제품을, Taq polymerase 와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, IL-4 와 IFN-γ는 ELISA kit (Boosource, U.S.A), antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system, U.S.A), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS) 는 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED는 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 재조합 TNF-α와 IL-1β는 R&D system 사 (Minneapolis, U.S.A) 제품을, PE-anti-CD3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, PE-anti-CD23, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-anti-CD11c, PE-anti-MHC class II는 Pharmingen 사 (Torreyana, Iraq) 제품을, anti-CD28, anti-CD3는 (Serotec, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), real time quantitative RT-PCR (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), bio-freezer (Sanyo, Japan), primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001, Korea), vaccum pump, rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), autoclave (Hirayama, Japan), imager system (Kodak, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ELISA reader (Molecular devices, U.S.A), cell strainer (FALCON, U.S.A), 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass, U.S.A) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

木瓜, 吳茱萸 및 각 50 g으로 구성된 배합약물(CS+ER) 100 g에 증류수 1,000 mL을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치 (Rotary evaporator, Büchi B-114, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 추출물 15.2, 16.8, 21.2 g을 얻어 수득율은 각각 15.2%, 16.8%, 21.2%로 확인되었으며, 획득한 추출물은 냉동 (-84°C) 보관하

면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Collagen 유발 관절염 (CIA) 생쥐 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 μ g를 DBA/10IaHsd 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 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 양성대조군과 CS, ER 및 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), CS, ER 및 배합약물 투여군으로 나누어 booster 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)를 매주 3회 각각 0.1 ml 씩 매일 복강에 주사하였으며, CS, ER 및 배합약물 (150 mg/kg) 투여군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) Arthritis index (AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/10IaHsd 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병률 (incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도(Table 1)를 1 주일에 1회씩 5주간 기록하였다.

Table 1. Grade of arthritis index

Grade	Level of severity
0	No arthritis
1	Small degree of arthritis
2	Light swelling
3	Medium swelling
4	Severe swelling
5	Severe swelling and non-weight-bearing

5) Draining lymph node (DLN), paw joint의 총세포 수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 draining lymph node (DLN), paw joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포 수 (absolute number)를 산출하였다.

6) 형광 유세포 분석

DBA/10IaHsd 생쥐에서 draining lymph node (DLN), paw joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, PE-anti-CD23, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-anti-CD11c, PE-anti-MHC class II 를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 draining lymph node (DLN), paw joint에서의 절대세포 수 (absolute number)를 산출하였다.

PBMC (peripheral blood mononuclear cell)는 heparin 이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1L 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 세포수를 측정하였다. 측정된 PBMC 세포를 5×10⁵/ml 세포로 조정된 후 4°C에서 면역형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석하였다.

7) 혈청 내 사이토카인 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6, TNF- α , IFN- γ 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

Collagen II 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4°C 냉장실에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음

antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 병리 조직 검사

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

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 unpaired Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 관절염 지수에 미치는 영향

관절염 유발 후 arthritis index값을 매주 한번씩 5주 동안 검사한 결과, 약물을 처리한 후 1주부터 MTX 투여군과 CS, ER 및 두 배합약물 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 1).

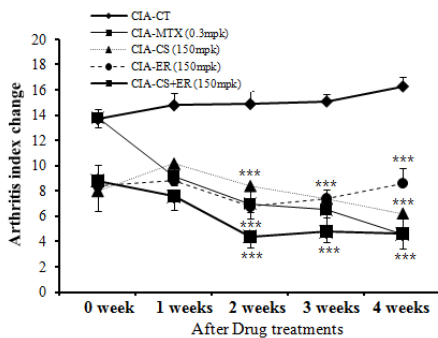


Fig. 1. Suppressive effect of CS, ER and their combination on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into four groups and each group was treated with DW (CIA-CT), MTX (CIA-MTX; 0.3 mg/kg) or CS, ER and their combination(150 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 ($p < 0.001$).

2 조직학적 변화

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX(0.3 mg/kg), CS, ER 및 두 배합약물 (150 mg/kg)를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색과 M-T 염색을 통하여 조직을 분석하였다. Fig. 2의 B는 CIA의 대조군으로 CIA에 의한 관절에 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, subsynovial

inflammation 그리고 활막세포의 hyperplasia의 침투가 일어나 연골과 뼈의 침투가 진행되었다. 그 외에도 활막의 파괴, 혈관의 확장, cartilage pannus junction 등을 관찰할 수 있다. 반면, MTX 처리군 (Fig. 2, C), CS, ER 투여군 (150 mg/kg) (Fig. 2, D, E), 그리고 CS, ER 배합약물 (150 mg/kg) (Fig. 2, F) 투여군에서는 대조군에 현저하게 관찰된 synovial paw joint cavity (JC)에서의 염증을 관찰할 수 없었고, 또한 관절 주변에서도 역시 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침투, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

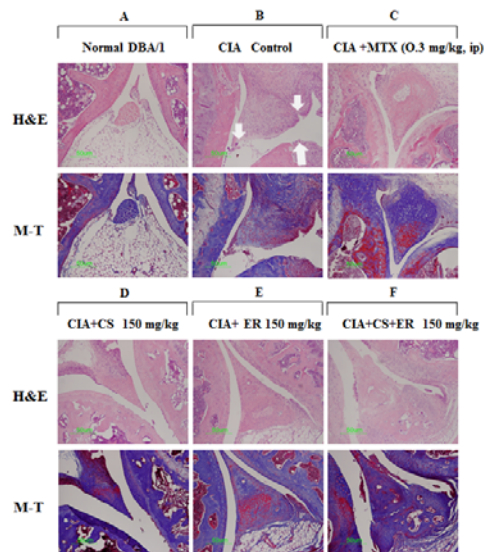


Fig. 2. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1OlaHsd mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin and Masson's Trichrome staining. Normal wild-type DBA/1OlaHsd mouse (A), control murine CIA (B), MTX-0.3 mg/kg (C), CS 150 mg/kg (D), ER 150 mg/kg (E) and CS plus ER 150 mg/kg (F) 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. Original magnifications: X 200.

3. DLN 및 paw joint의 총 세포 수에 미치는 영향

DBA/1OlaHsd mice에 4주간 CS, ER 및 배합약물을 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 모든 군에서 유의성 있게 감소되었으며(Fig. 3A), Paw joint에서는 정상군이 $5.0 \pm 1.0 (\times 10^5)$, 대조군이 $13.75 \pm 3.75 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $7.75 \pm 0.25 (\times 10^5)$, CS, ER 및 배합약물 (150 mg/kg) 투여군이 $19.0 \pm 3.0 (\times 10^5)$, $6.0 \pm 1.5 (\times 10^5)$, $5.0 \pm 0.5 (\times 10^5)$ 로 나타나 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소되었다(Fig. 3B).

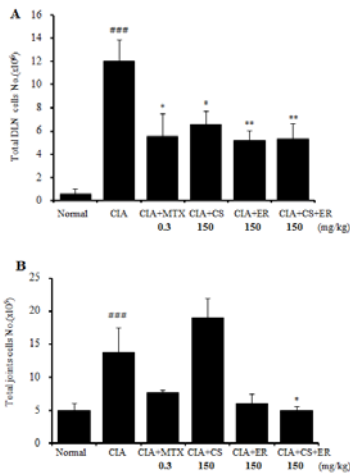


Fig. 3. Effect of CS, ER and CS plus ER on total cell number of DLN and paw joints in CIA mice. Normal, CT (Control), MTX (0.3 mg/kg) CS, ER and CS plus ER (150 mg/kg). Statistically significant value compared with CT by T test ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Statistically significant value compared with normal by T test ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Normal : Normal DBA/10laHsd mouse group. CT : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). MTX : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. CS 150 : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and treated with CC (150 mg/kg) once a day for 4 weeks. ER 150 : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and treated with ER (150 mg/kg) once a day for 4 weeks. CS plus ER 150 : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and treated with CS plus ER (150 mg/kg) once a day for 4 weeks.

4. 면역세포에 미치는 영향

1) PBMC 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD4⁺ & CD8⁺ 세포에 미치는 영향

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 수 변화를 측정된 결과, 정상군이 각각 24.4 ± 0.39%, 18.1 ± 3.11% 대조군이 각각 29.2 ± 1.88%, 14.5 ± 0.43%, MTX 투여군이 24.8 ± 3.79%, 15.2 ± 0.13%, CS 투여군이 18.5 ± 3.49%, 12.3 ± 0.75%, ER 투여군이 20.5 ± 4.04%, 11.4 ± 2.85%, 배합약물 투여군이 25.2 ± 2.61%, 14.9 ± 3.2%로 대조군에 비하여 CS 투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

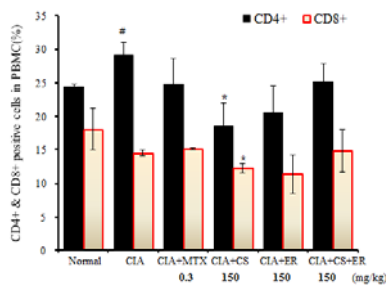


Fig. 4. Effects of CS, ER and CS plus ER on Proportion of CD4⁺ & CD8⁺ cells in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Collagen Induced Arthritis Mice. Peripheral blood mononuclear cells (10⁶ cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of CS, ER and CS plus ER. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4 & anti-CD8 antibody and analyzed by flow cytometer.

(2) B220⁺/CD23⁺ 세포에 미치는 영향

PBMC 내 B220⁺/CD23⁺ 세포 수 변화를 측정된 결과, B220⁺/CD23⁺ 세포 수는 정상군이 15.9 ± 2.45%, 대조군이 26.8 ± 6.65%, MTX 투여군이 14.2 ± 1.75%, CS 투여군이 26.2 ± 9.40%, ER 투여군이 23.7 ± 3.61% 및 배합약물 투여군이 23.2 ± 2.1%로 나타나 모든 군에서 대조군에 비하여 유의성 변화가 나타나지 않았다(Fig. 5).

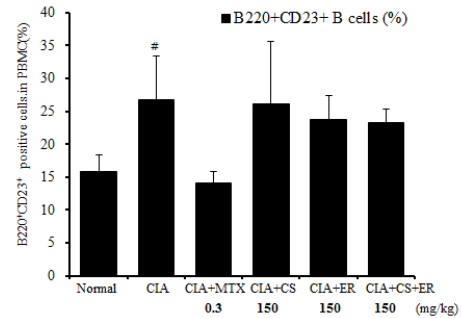


Fig. 5. Effects of CS, ER and CS plus ER on Proportion of B220⁺/CD23⁺ cells in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Collagen Induced Arthritis Mice.

(3) Granulocytes 세포 발현에 미치는 영향

PBMC 내 granulocytes 세포 수 변화를 측정된 결과, 정상군이 26.2 ± 1.37%, 대조군이 40.1 ± 2.55%, MTX 투여군이 33.2 ± 2.0%, CS 투여군이 36.7 ± 3.55%, ER 투여군이 29.4 ± 3.05% 및 배합약물 투여군이 29.0 ± 1.20%로 나타나 ER 및 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 있게 감소되었다(Fig. 6).

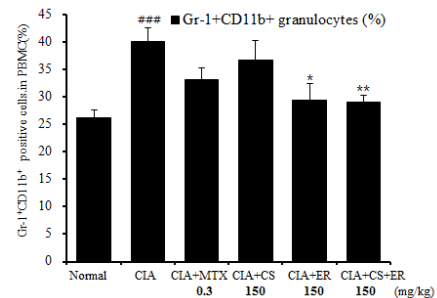


Fig. 6. Effects of CS, ER and CS plus ER on Proportion of granulocytes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Collagen Induced Arthritis Mice.

Peripheral blood mononuclear cells (10⁶ cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of CS, ER and CS plus ER. The cells were incubated with PE-anti-Gr-1 and FITC-anti-CD11b antibody and analyzed by flow cytometer.

2) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군이 각각 3.4 ± 2.2 (×10⁴), 1.7 ± 1.0 (×10⁴), 대조군이 각각 35.4 ± 2.6 (×10⁴), 31.1 ± 8.9 (×10⁴), MTX 투여군이 14.7 ± 2.9 (×10⁴), 11.6 ± 3.1 (×10⁴), CS 투여군이 21.9 ± 6.0 (×10⁴), 16.1 ± 2.3 (×10⁴), ER 투여군이 16.1 ± 1.8 (×10⁴), 13.6 ± 1.4 (×10⁴), 배합약물 투여군이 19.9 ± 3.9 (×10⁴), 11.8 ± 3.0 (×10⁴)로 나타나, CD4⁺ 세

포수가 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 7).

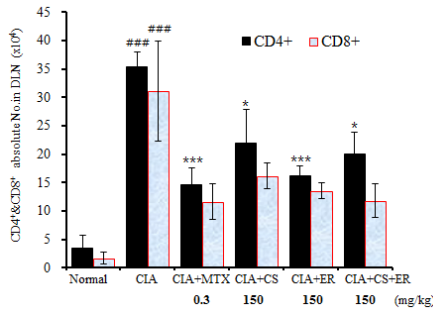


Fig. 7. Effects of CS, ER and CS plus ER on absolute number of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells in Draining Lymph Node of Collagen Induced Arthritis Mice.

Draining lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of CS plus ER. The cells were incubated with PE-anti-CD3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8 and analyzed by flow cytometer.

(2) CD3⁺/CD69⁺ 세포 수에 미치는 영향

DLN에서 CD3⁺/CD69⁺ 세포 수 변화를 측정한 결과, 정상군이 $0.6 \pm 0.39 (\times 10^4)$, 대조군이 각각 $24.3 \pm 3.55 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $6.7 \pm 2.76 (\times 10^4)$, CS 투여군이 $10.3 \pm 1.14 (\times 10^4)$, ER 투여군이 $6.7 \pm 0.15 (\times 10^4)$, 배합약물 투여군이 $7.8 \pm 3.18 (\times 10^4)$ 로 나타나 모든 약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 8).

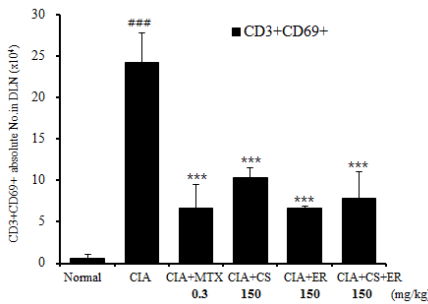


Fig. 8. Effects of CS, ER and CS plus ER on Proportion of CD3⁺/CD69⁺ cells in Draining Lymph Node of Collagen Induced Arthritis Mice.

(3) MHC class II⁺/CD11c⁺ 세포 발현에 미치는 영향

DLN에서 MHC class II⁺/CD11c⁺ (myeloid Dendritic cell) 세포 수를 측정한 결과, 정상군이 $0.16 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군이 각각 $4.51 \pm 0.2 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $0.97 \pm 0.5 (\times 10^4)$, CS 투여군이 $1.69 \pm 0.3 (\times 10^4)$, ER 투여군이 $0.84 \pm 0.0 (\times 10^4)$, 배합약물 투여군이 $0.76 \pm 0.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 모든 약물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 9).

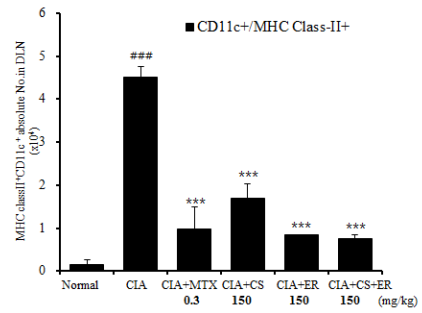


Fig. 9. Effect of CS, ER and CS plus ER extract on the of MHC class II⁺/CD11c⁺ cells in Draining Lymph Node of Collagen Induced Arthritis Mice.

Draining lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of CS plus ER. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD11c and PE-conjugated anti-MHC class II analyzed by flow cytometer.

3) Paw joint 내 CD4⁺ 및 CD11⁺b/Gr-1⁺ 세포에 미치는 영향

Paw joint에서 CD4⁺ 및 CD11⁺b/Gr-1⁺ 세포 수를 absolute number로 산출한 결과, 각각 정상군이 $1.2 \pm 0.1 (\times 10^5)$, $7.1 \pm 5.35 (\times 10^5)$, 대조군이 $11.7 \pm 2.5 (\times 10^5)$, $31.7 \pm 7.83 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.7 \pm 0.6 (\times 10^5)$, $5.1 \pm 1.19 (\times 10^5)$, CS 투여한 실험군은 $13.1 \pm 1.2 (\times 10^5)$, $39.4 \pm 5.29 (\times 10^5)$, ER 투여한 실험군은 $3.7 \pm 0.7 (\times 10^5)$, $5.2 \pm 1.67 (\times 10^5)$, 배합약물 투여한 실험군은 $2.8 \pm 0.8 (\times 10^5)$, $5.1 \pm 0.73 (\times 10^5)$ 로 나타나, CD4⁺ 및 CD11⁺b/Gr-1⁺ 세포 수가 ER, 및 배합약물 투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 10).

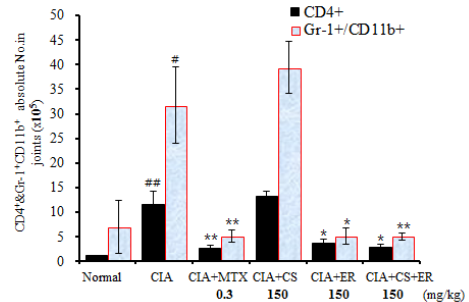


Fig. 10. Effects of CS, ER and CS plus ER on the absolute number of CD4⁺ and CD11⁺b/Gr-1⁺ cells in paw joint of Collagen Induced Arthritis Mice. Paw joint (PJ) cells ($\times 10^5$ cells/ml) were isolated following 4-weeks administration of CS plus ER. Cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD11b, anti-CD4, PE-conjugated anti-Gr-1 antibody, and analyzed by flow cytometer.

4) 혈청 내 염증성 사이토카인 생성량에 미치는 영향

혈청 내 TNF- α 생성량을 분석한 결과, 정상군이 7.9 ± 1.7 (pg/ml), 대조군이 66.6 ± 11.3 (pg/ml), MTX 투여군이 18.4 ± 6.5 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이 61.2 ± 11.4 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 23.7 ± 5.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 34.9 ± 2.6 (pg/ml)로 나타나, ER 및 배합약물 투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 11).

혈청 내 IL-6 생성량을 분석한 결과, 정상군이 103.6 ± 6.2 (pg/ml), 대조군이 807.4 ± 132.6 (pg/ml), MTX 투여군이 379.3 ± 44.6 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이

705.5 ± 90.2 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 419.9 ± 94.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 552.4 ± 100.6 (pg/ml)로 나타나, ER 및 배합약물 투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 11).

혈청 내 IFN-γ 생성량을 분석한 결과, 정상군이 48.6 ± 2.7 (pg/ml), 대조군이 84.3 ± 17.2 (pg/ml), MTX 투여군이 64.9 ± 7.4 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이 69.9 ± 11.4 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 69.3 ± 5.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 74.9 ± 7.4 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비해 감소되었으나, 유의성은 없었다(Fig. 11).

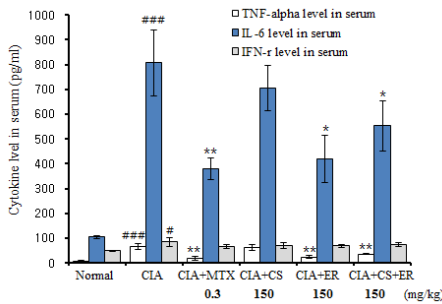


Fig. 11. Effects of CS, ER and CS plus ER on the level of TNF-α, IL-6 and IFN-γ in the serum of Collagen Induced Arthritis mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of cytokines were determined using a commercially available ELISA kit. CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μg/ml), MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μg/ml) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. CS 150 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μg/ml) and treated with CS(150 mg/kg) once a day for 4 weeks. ER 150 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μg/ml) and treated with ER (150 mg/kg) once a day for 4 weeks. CS+ER 150 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μg/ml) and treated with CS plus ER (150 mg/kg) once a day for 4 weeks.

5) 혈청 내 anti-IgG Type II collagen 항체량 측정

혈청 내 anti-IgG Type II collagen 항체량을 측정 분석한 결과, 정상군의 anti-IgG Type II collagen 발현량은 정상군이 43.63 ± 1.09 (×10³ U/ml), 대조군이 521.8 ± 102.9 (×10³ U/ml), MTX 투여군이 141.27 ± 9.63 (×10³ U/ml), CS 투여한 실험군이 460.72 ± 86.2 (×10³ U/ml), ER 투여한 실험군이 241.98 ± 39.1 (×10³ U/ml), 배합약물 투여한 실험군이 339.82 ± 28.19 (×10³ U/ml)로 나타나 ER 및 배합약물 투여군에서 대조군의 collagen II 항체 발현량에 비해 유의성 (*p<0.05, ***p<0.001) 있게 감소되었다(Fig. 12).

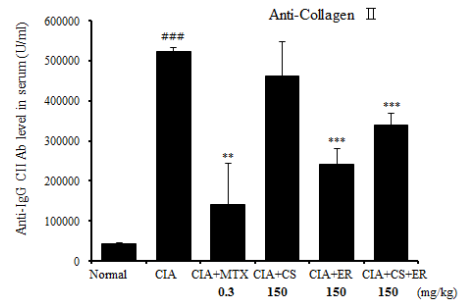


Fig. 12. Effects of CS, ER and CS plus ER on levels of collagen II specific IgG antibody in the serum of CIA mice.

Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of mouse anti-IgG type II collagen antibody was determined using a commercially available ELISA kit.

고찰

류마티스성 관절염, 통풍, 좌골신경통 및 각종 관절염 등은 병리 상태와 임상 증상에 있어서 한의학의 痹病의 범주에 속한다고 할 수 있다.

한의학에서는 痹病에 대하여 다양하게 설명하고 있다. 《素問 痹論》에서는 痹病의 病因과 분류에 대해 "風寒濕三氣雜至, 合而為痹也。其風氣勝者為行痹, 寒氣勝者為痛痹, 濕氣勝者為著痹也"¹⁴⁾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"^{4,14)}라 하여 濕痺를 언급하였고, 또 "血痺病從何得之 師曰: 夫尊榮人骨弱肌膚盛, 重因疲勞汗出, 臥不時動搖, 加被微風, 遂得之。血痺, ... 外證身體不仁, 如風痺狀"라 하여 血痺에 대하여도 언급하였다^{4,14)}.

한편, 서양의학에서 류마티스관절염의 발병에는 유전적 소인과 환경적인 요인이 모두 작용하는 것으로 추측되고 있다. 류마티스 관절염의 활막에서 발견되는 사이토카인은 주로 대식세포와 활막세포로부터 분비되며, 주변의 염증 세포들을 활성화, 유입시키고 활막세포의 증식을 촉진하여 활막염을 항진, 지속 시킴으로써 관절의 손상을 일으킨다³⁾. 다시 말하면, T 림프구, 활막세포 (synovocytes), 수지상세포 (dendritic cells), B 림프구, 비만세포, 파골세포 (osteoblast) 및 이들 세포에서 생성되는 여러 cytokine의 상호작용에 의하여 관절염이 증가 또는 호전되는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

류마티스 관절염의 치료는 스테로이드와 비스테로이드성 항염제, 부신피질 호르몬제, 항류마티스제, 세포독성제, 생물학적 제제 등 여러 가지 방법으로 이루어지고 있으나 장기간의 사용으로 인한 부작용이 우울증, 위장관의 궤양 유발, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 유발하고 있어 안전하고 효과적인 치료 방법이 요구되고 있는 실정이다¹⁶⁾. 따라서 류마티스성 관절염의 진행을 억제하고, 부작용을 줄일 수 있는 효과적인 신물질로서 최근 한약재에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

吳茱萸는 운향과(藟香科: Rutaceae)에 속한 落葉灌木 혹은 小喬木인 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 등의 미성숙 과실로, 8~10월에 綠褐色이 되고 心皮가 갈라지기 전에 채취한 것을 사용한다. 吳茱萸의 性味는 辛苦熱하고 散寒止痛, 降逆止嘔, 助陽止瀉하여, 厥陰頭痛, 寒疝腹痛, 寒濕脚氣,

經行腹痛, 腕腹脹痛, 嘔吐吞酸, 五更泄瀉 등에 사용한다¹⁷⁾.

木瓜는 장미과(薔薇科: Rosaceae)에 속하는 落葉灌木인 木瓜나무 *Chaenomeles sinensis* Koehne 등의 성숙한 과실로서, 性味는 溫하고 酸하여 舒筋活絡, 和胃化濕하여, 濕痺拘攣, 腰膝關節酸重疼痛, 吐瀉轉筋, 脚氣水腫 등에 적용한다¹⁷⁾.

본 연구에서는 RA를 심화 혹은 억제시키는 이 들 요소들에 전통 한약재 중 風濕으로 인한 다양한 腰膝의 疼痛과 無力을 다스리는 吳茱萸와 木瓜의 배합약재를 응용하여 유의한 결과를 얻어냈다.

관절염 유발 후 arthritis index값을 매주 한번씩 5주 동안 검사한 결과, 약물을 처리한 후 1주부터 MTX 투여군과 CS, ER 및 두 배합약물 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다. 이는 CS, ER 및 배합약물이 RA를 억제시키는 효과가 있음을 의미한다. 그리고 조직학적으로도 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소했다. DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 CS, ER 및 배합약물 투여군에서 유의성 있게 감소하였으며, Paw joint에서는 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. CIA 생쥐의 PBMC 내에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 수 변화를 측정한 결과, CS투여군에서 대조군에 비해서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 수가 유의성 있게 감소되었다. B220⁺/CD23⁺ 세포의 수는 대조군에 비해서 모든 약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. Granulocytes 세포 변화를 측정한 결과, ER 및 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. Draining lymph node(DLN)에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 비율을 측정한 결과, CS, ER 및 배합약물 투여군 모두에서 대조군에 비하여 CD4⁺는 유의성 있게 감소되었으나, CD8⁺ 세포의 비율은 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 이는 관절염에서 helper T cell의 변화가 suppressor T cell의 변화보다 직접적인 영향을 주는 것으로 판단된다. CD3⁺/CD69⁺ 세포의 수는 CS, ER 및 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. DLN에서 MHC class II⁺/CD11c⁺ 세포 변화를 측정한 결과, CS, ER 및 배합약물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

Paw joint에서 CD4⁺ 및 CD11^b/Gr-1⁺ 세포 수를 absolute number로 산출한 결과, ER 및 배합약물 투여군에서 CD4⁺ 및 CD11^b/Gr-1⁺ 세포 수가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.

혈청 내 TNF- α 생성량을 분석한 결과, 정상군이 7.9 \pm 1.7 (pg/ml), 대조군이 66.6 \pm 11.3 (pg/ml), MTX 투여군이 18.4 \pm 6.5 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이 61.2 \pm 11.4 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 23.7 \pm 5.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 34.9 \pm 2.6 (pg/ml) 로 나타났다.

혈청 내 IL-6 생성량을 분석한 결과, 정상군이 103.6 \pm 6.2 (pg/ml), 대조군이 807.4 \pm 132.6 (pg/ml), MTX 투여군이 379.3 \pm 44.6 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이 705.5 \pm 90.2 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 419.9 \pm 94.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 552.4 \pm 100.6 (pg/ml) 로 나타났다.

혈청 내 IFN- γ 생성량을 분석한 결과, 정상군이 48.6 \pm 2.7 (pg/ml), 대조군이 84.3 \pm 17.2 (pg/ml), MTX 투여군

이 64.9 \pm 7.4 (pg/ml)이었으며, CS 투여한 실험군이 69.9 \pm 11.4 (pg/ml), ER 투여한 실험군이 69.3 \pm 5.8 (pg/ml), 배합약물 투여한 실험군이 74.9 \pm 7.4 (pg/ml) 로 나타났다 (Fig. 11).

혈청 내 collagen II 항체량을 측정 분석한 결과, ER 및 배합약물을 투여한 실험군이 대조군의 collagen II 항체 발현량에 비해 유의성 있게 감소되었다.

최근 연구보고에 의하면 CD19⁺ B 세포 또한 관절염의 병리기전에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며¹⁸⁾, 특히 type II collagen에 의해 유도된 관절염 모델에서 B 세포가 제거된 경우에는 관절염이 발생되지 않는 것으로 보고 되었는데¹⁹⁾, B220⁺/CD23⁺ B 세포가 PBMC 내에서 감소되었으나 유의성 있는 변화가 없었다.

CD69⁺는 말초 림프기관의 T세포와 B세포의 작은 아집단으로, 림프세포에 표현되고 림프세포에 의해 활성화되는 초기 활성화항원이다²⁰⁻²²⁾. 그 외 CD69⁺는 다양한 만성염증질환의 림프세포 침윤에서 나타난다²³⁾.

RA의 유발 및 관절 파괴에 있어서 T 세포 중 IFN- γ 생산이 우세한 상태로 CD4⁺ Th1 세포와 대식세포는 만성 RA에서 활막의 파괴 및 침윤, 그리고 질환의 진행에 주도적 역할을 담당한다²⁴⁾. CD4⁺ T 세포와는 달리 CD8⁺ T 세포는 CIA의 병리에서 억제 역할을 하는 것으로 보고되어²⁵⁾, 이 둘 세포는 관절염 억제와 진행에 중요한 역할을 담당하며, 그 양상이 조직이나 위치에 따라 달리 기능을 갖는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. CS, ER 및 배합약물을 투여했을 때, PBMC에서는 CS 투여군에서 CD4⁺ 및 CD8⁺세포 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

RA는 MHC class II HLA항원과의 연관성이 가장 크며, HLA class II의 주된 기능은 CD4⁺ T세포에 항원성 peptide를 나타내고, 활성화된 CD4⁺ T세포는 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 생산하고, 조직을 파괴하는 matrix metalloprotease(MMP)를 분비하며, IL-1, IL-6, TNF- α 는 RA에서 염증을 유도하는 중요한 cytokine이다²⁷⁾. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연결부의 침식에 의해 발생한다. DLN에서 MHC class II⁺/CD11c⁺ (Dendritic cell) 세포 수를 측정한 결과, CS, ER 및 배합약물 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

관절염 염증 부위에는 CD11b⁺Gr-1⁺(과립구세포)세포의 침윤이 많이 일어나는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. CS, ER 및 배합약물 200, 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 CD11b⁺Gr-1⁺(과립구세포)세포의 총세포수가 유의성 있게 감소를 나타내었다.

RA는 만성 염증성 질환으로 관절내의 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 초기 및 진행 단계에 이들 염증성 사이토카인과 함께 CD4⁺ T 림프구 등의 면역세포들이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 또한, Th1과 Th2 사이토카인의 balance가 깨지면서 Th1-편향의 사이토카인이 상대적으로 과잉 생성돼 나타나는 질환으로 알려져 있다^{30,31)}. CS, ER 및 배합약물 150 mg/kg 농도로 투여한 CIA 생쥐에서 혈청내 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IFN- γ 의 분비가 감소되었으며, 특히 TNF- α 및 IL-6가 유의성 있는 감소를

보였다.

관절조직에 특이적으로 존재하는 항원부보 물질로는 연골 주성분인 Type II collagen 등이 주요물질로 알려져 있으며, 콜라겐 특이 항체를 분리하여 조사해 보면 IgG 항체의 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다³²⁾. IgG는 류머티스성 인자(RA factor)로서 면역글로불린 G (IgG)의 Fc 영역에서 자연적으로 발생하는 자가항체(autoantibody)이다. 혈청 내 anti-IgG Type II collagen 항체량을 측정 분석한 결과, ER 및 배합약물을 투여하였을 때 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것을 확인하였다.

이상의 결과로 보아, CS, ER 및 배합약물이 항류마티스 효능을 가지는 면역조절물질 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

결론

Type II Collagen으로 유도된 관절염에 대한 CS, ER 및 배합약물의 억제 효과를 실험적으로 검색하고자, DBA/1 생쥐에서의 콜라겐으로 관절염을 유발하여, 관절염 발생률, 관절 조직 변화, 관절 조직에서의 면역학적 변화, 혈청 내 rheumatoid factor 농도 및 draining lymph node (DLN), PBMC 에서의 면역 세포 변화 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CS, ER 및 두 배합약물은 콜라겐으로 유발된 관절염의 발생 (arthritis index)을 유의적으로 억제하였다.
2. CS, ER 및 두 배합약물은 관절염이 발생한 조직에서 염증 세포의 유입과 연골의 파괴를 유의적으로 감소시켰다.
3. Paw joint에서는 배합약물이 총 세포 수를 감소시켰으며, DLN에서는 CS, ER 및 배합약물 투여군 모두에서 총 세포 수가 현저하게 감소되었다.
4. PBMC에서 CS는 CD4⁺, CD8⁺ 세포 비율을 감소시켰으며, ER 및 두 배합약물은 granulocytes 세포 수를 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
5. DLN에서는 CS, ER 및 배합약물 투여군 모두에서 CD4⁺ 세포 수, CD3⁺/CD69⁺ 세포 및 MHC class II⁺/CD11c⁺ (Dendritic cell) 세포 수가 유의성 있게 감소되었다.
6. Paw joint에서 ER 및 두 배합약물 투여군에서 CD4⁺ 및 CD11^b/Gr-1⁺ 세포 수가 유의성 있게 감소되었다.
7. ER 및 두 배합약물은 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.
8. ER 및 두 배합약물은 anti-IgG type II collagen을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 CS, ER 및 배합약물은 RA에서 효과가 기대되며, 임상에서 RA에 쓸 각 처방에 이 약물을 배합할 시에는 임상에서도 효과를 가져 올 것으로 기대된다.

References

1. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 ; 358 : 903-11.
2. Wolfe T, Mitchell DM, Siley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinhkssel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994 ; 37 : 481-94.
3. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 ; 7(6) : 429-42.
4. Lee HI, Yang CH, Kwon SJ. East and west medical consideration of Rheumatoid arthritis. *J Jeahan Orient Med Acad*. 1999 ; 4(1) : 199-209.
5. Min BK, Oh MS. Suppressive Effect of GJB-7 on Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J Korean Oriental Med*. 2010 ; 31(4) : 63-78.
6. Lee SH. Clinical medicine Herb pairs. *Euisungdang*. 2008 : 302-3.
7. Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. Anti-Inflammatory Effect of *Evodia Officinalis* Dode in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *Kor J Herbology*. 2008 ; 23(1) : 29-38.
8. Shin YW, Bae EA, Cai XF, Lee JJ, Kim DH. *In vitro* and *in vivo* antiallergic effect of the fructus of *Evodia rutaecarpa* and its constituents. *Biol Pharm Bull*. 2007 ; 30(1) : 197-9.
9. Yu X, Wu DZ, Yuan JY, Zhang RR, Hu ZB. Gastroprotective effect of fructus evodiae water extract on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Am J Chin Med*. 2006 ; 34(6) : 1027-35.
10. Ko HC, Wang YH, Liou KT, Chen CM, Chen CH, Wang WY, Chang S, Hou YC, Chen KT, Chen CF, Shen YC. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *Eur J Pharmacol*. 2007 ; 555(2-3) : 211-7.
11. Gao H, Wu L, Kuroyanagi M, Harada K, Kawahara N, Nakane T, Umehara K, Hirasawa A, Nakamura Y. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells. *Chem Pharm Bull*. 2003 ; 51(11) : 1318-21.
12. Oku H, Ueda Y, Ishiguro K. Antipruritic effects of the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Biol Pharm Bull*. 2003 ; 26(7) : 1031-4.
13. Yoo JH, Han SH, Kil GJ. Active Effect of Anticoagulant

- Effects in *Chaenomelis Fructus Water Extract*. *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(2) : 7–11.
14. Kwon YD, Song YS. The studies of east-western medicine on Rheumatoid arthritis. *J Korean Orient Med*. 1994 ; 15(2) : 373–96.
 15. Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005 ; 12(3) : 183–9.
 16. Kim MJ, Yoon JH, Kim KH, Lee SD, Kim KS. Acupuncture Therapy Literature Study on the Knee Rheumatoid Arthritis. *J Korean Acupuncture Moxibustion Soc.* 2005 ; 22(1) : 191–201.
 17. Herbology Editorial Committee Of Korean Medicine Schools. *Herbology*. Seoul : Younglimsa, 2007 : 315–16, 379–80.
 18. Deng GM, Lenardo M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drug discovery Today: Disease Mechanisms*. 2006 ; 3(2) : 163–8.
 19. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*. 1998 ; 111 : 521–6.
 20. Hara T, Jung LK, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide linked early activation antigen (EA 1) by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med*. 1986 ; 164(6) : 1988–2005.
 21. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med*. 1988 ; 168(5) : 1621–37.
 22. Testi R, Phillips JH, Lanier LL. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol*. 1989 ; 142(6) : 1854–60.
 23. Laffón A, García-Vicuña R, Humbría A, Postigo AA, Corbí AL, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1991 ; 88(2) : 546–52.
 24. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996 ; 39(12) : 1961–9.
 25. Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4⁺ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol*. 1994 ; 97(2) : 212–8.
 26. Williams RO, Whyte A, Waldmann H. Resistance to collagen induced arthritis in DBA/1 mice by intraperitoneal administration of soluble type II collagen involves both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Autoimmunity*. 1989 ; 4(4) : 237–45.
 27. Bradley DS, Nabozny GH, Cheng S, Zhou P, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice: implications in human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1997 ; 100(9) : 2227–34.
 28. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, O'Valle F, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum*. 2007 ; 56(2) : 531–43.
 29. Brahn E, Peacock DJ, Banquerigo ML, Liu DY. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) on collagen arthritis. *Lymphokine Cyfukine Res*. 1992 ; 11 : 253.
 30. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007 ; 6(3) : 169–75.
 31. D'Elios M, Del Prete G. Th1/Th2 Balance in Human Disease. *Transplant Proc*. 1998 ; 30(5) : 2373–7.
 32. Youn JH. Lessons for the pathogenesis of rheumatoid arthritis acquired from experimental animal models. *Hanyang Med Rev*. 2005 ; 25(2) : 53–66.