

加味桂芍知母湯 주정 추출물이 류마티스 관절염 인자에 미치는 영향

심부용[#], 박지원, 김동희^{*}

대전대학교 한의과대학 병리학과

Effect of Gamikyejakjimo-tang(jiāwèiguìsháozhīm-tāng) ethanol extract on Rheumatoid Arthritis factors

Boo-Yong Sim[#], Ji-Won Bak, Dong Hee Kim^{*}

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to prove the effect of Gamikyejakjimo-tang (jiāwèiguìsháozhīm-tāng, GK) on rheumatoid arthritis.

Methods : We checked viability and measured production of IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α in RAW 264.7 cell after treat by GK. Then we measured rheumatoid arthritis index score of DBA/1 mice with rheumatoid arthritis induced by CIA after GK oral administration, checked IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α and hs-CRP tests in serum. Also we were observed mRNA expression of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in spleen by RT-PCR.

Results : GK showed cell viability of 100% or higher in all concentration in RAW 264.7 cells. GK inhibited LPS-induced productions of rheumatoid arthritis mediators cytokine in RAW 264.7cells. GK treated group showed improvement from rheumatoid arthritis at decreased the index score. Also, GK treated group decreased level in serum of IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α and hs-CRP tests by 31%, 35%, 20%, 57% and 58% respectively. Finally, GK treated group showed decrease expression of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α mRNA in spleen by 46%, 51%, 25% and 42% respectively.

Conclusions : In this study, in-vitro and in-vivo results observed rheumatoid arthritis factors cytokine of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α decrease in RAW 264.7 cells, serum, mRNA expression. Also, GK showed decrease of inflammation figure in hs-CRP tests depending on effect of rheumatoid arthritis. Thus, these results can used as a effective drug of GK for rheumatoid arthritis.

Key words : Cytokine, hs-CRP, Gamikyejakjimo-tang, mRNA, Rheumatoid arthritis, serum

서론

류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, 이하 RA)은 자가 면역 기전으로 관절 활막에 만성 염증이 발생하여 국소적인 관절 내 골 파괴와 전신적인 골감소를 특징으로 하는 자가 면역 질환이다¹⁾. 주로 40대에서 70대 사이의 연령대에 가장 흔하며 발병율은 연령에 따라 증가한다²⁾.

RA는 세포매개성 면역반응 (cell mediated immune response) 을 하는 협조/유도 T 세포 (CD4+) 중 제 1형 T 세포 (type

1 helper cell, Th1)가 Th2 세포보다 편향되어 발달함으로써 Th1 사이토카인이 대량 생산되어 유발된다^{3,4)}.

Th1 사이토카인은 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ 등이 대표적으로 알려져 있는데, 이들 사이토카인은 염증반응을 촉진시키므로써 RA를 더욱 악화시킨다^{5,6)}. 또한, 최근에는 Th17이 관절 내 세포들로부터 TNF- α 와 IL-1 같은 주요 cytokine들과 IL-6, 단백분해 효소 등의 분비를 유도하여 염증 반응을 심화시켜 급성 관절염을 만성화 시킨다는 것이 많은 연구 결과들을 통해 밝혀짐에 따라 RA의 새로운 매개체로

*Corresponding author : Dong Hee Kim, Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University
· Tel : +82-42-280-2623 · FAX : +82-42-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : Boo-Yong Sim, Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University
· Tel : +82-42-280-2828 · FAX : +82-42-280-2624 · E-mail : boyish3@naver.com
· Received : 13 August 2014 · Revised : 11 September 2014 · Accepted : 11 September 2014

대두되고 있다⁷⁻⁹⁾. 그러므로 RA의 초기 및 진행단계에서 이와 같은 Th1과 Th17 cytokine을 억제하는 것이 중요하다고 할 수 있다¹⁰⁾.

현재 류마티스성 관절염 치료제로 아스피린, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬, 질환 변형 약제 (DMARD : disease modifying anti rheumatic drug), 항TNF- α 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다^{11,12)}. 그러나 이러한 치료제들은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안전성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다¹³⁾.

桂芍知母湯은 《金匱要略》¹⁴⁾에 "祛風散寒除濕 하고 清熱 한다" 이라고 기재된 이래 오랜 임상 경험을 통하여 관절염을 비롯하여 광범위하게 응용되는 처방이다. 본 시료인 가미계작지모탕은 여기에 이미 실험적으로 RA에 효과가 있음이 증명된 牛膝¹⁵⁾, 威靈仙¹⁶⁾, 川烏頭¹⁷⁾를 가미한 처방이다.

이에 본 실험에서는 RAW 264.7 세포내 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 등의 cytokine 생성량 측정과 더불어 collagen-induced arthritis (CIA) 병태 모델에서 혈청 내 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 생성량 및 유전자 발현량을 측정하였다. 이 밖에 육안적 평가 및 hs-CRP 검사 등의 연구를 통하여 임상에서의 활용성을 제고함과 동시에 향후 보다 효과적이고 안전한 한의학적 치료제 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 가미계작지모탕 (Gamikyekjakjimo-tang 이하, GK로 표기)의 구성 약재들은 (주)웅니허브에서 구입 하였고, 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용 하였으며, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The prescription of GK

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	12
威靈仙	Clematidis Radix	12
川烏頭	Aconiti Tuber	12
桂枝	Cinnamomi Ramulus	9
芍藥	Paeoniae Radix	9
知母	Anemarrhenae Rhizoma	9
防風	Saposhnikoviae Radix	9
麻黃	Ephedrae Herba	9
牛膝	Achyranthis Radix	9
乾薑	Zingiberis Rhizoma	9
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	9
附子	Aconiti Lateralis Radix Preparata	8
Total amount		116

2. 동물 및 사료

실험동물인 수컷 5주령의 DBA/1 mouse (20~23 g)는 (주)중앙실험동물에서 공급 받아 실험 당일까지 고품사료 (주)퓨

리나)와 물을 충분히 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간 - 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험 윤리 위원회의 승인 (동물사용 윤리위원회 승인 번호 -DJUARB 2014-014)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험하였다.

3. 시약 및 기기

사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Mouse IL-17AF ELISA Ready-SET-Go (eBioscience CO., USA), total RNA prep kit (Intronbio., Korea)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), PCR machine (Thermal Dynamic., U.S.A), thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), Luminex (Millipore Co., USA) 등을 사용하였다.

4. 시료 추출

GK 1첩 (116 g)에 80% 주정 (C₂H₅OH) 1000 ml을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 14.3 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

5. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37°C, 5% CO₂) 에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상 으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

6. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 GK를 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도

의 변화를 측정한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

7. 세포 내 cytokine 측정

세포 내 염증성 cytokine 측정은 luminex를 사용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, GK를 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 를 측정하였다.

8. 관절염 유발

2 mg/mL 농도의 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA)와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 혼합액 0.1 mL (제2형 콜라겐 100 μg)을 꼬리의 기저부에서 1.5~3 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하여 1차 유발을 하였다. 1차 유발 후 2주 후에 1차 시기와 동일하게 CFA 대신 incomplete Freund's adjuvant (IFA)과 혼합하여 한쪽 발바닥에 주사하여 유발하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 매일 1회, 오후 2시에 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 indomethacin (이하, Indo) 투여군과 GK 투여군은 각각 200 μl (200 mg/kg) 씩 투여하였다. 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다.

9. Rheumatoid Arthritis Index(AI) 측정

RA 지수 (Rheumatoid Arthritis index score) 확인을 위하여 2차 주사 이후에 CIA생쥐의 각 4개의 발 (paw)에서 각 발마다 0~4점 (총 0~16점)의 임상점수, 발목 두께의 변화, 발생률 등을 측정하였다. 측정은 9주차부터 13주차까지 매주마다 기록하였으며 기준은 다음과 같다(Table2).

Table 2. Standard of Arthritis index score

Arthritisindex	Inflammation-induceddegree
0	no arthritis
1	small degree of arthritis
2	light swelling
3	medium swelling
4	severe swellen

10. 혈청 내 cytokine 측정 및 혈액 내 hs-CRP 검사

실험 종료 후 ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 가지고 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 Luminex로 측정하였으며, IL-17 생성량 측정은 ELISA kit를 이용하여 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 고감도 C 반응성 단백질검사법 hs-CRP

(high-sensitivity C-reactive Protein) 검사는 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 서울의과학 연구소에 분석 의뢰 하였다.

11. RNA 분리 및 realtime PCR 분석

비장조직에서 발현된 mRNA를 측정하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 분리한 비장 조직을 동결시킨 뒤 total RNA prep kit을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 반응은 추출한 RNA를 RT premix kit의 mixture를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였으며 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MHCl₂)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 아래와 같다(Table 3). 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자발현의 여부를 UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하고, RNA 발현을 나타내었다.

Table 3. The Sequences of Primers

Primer	F/R	Sequences
IL-1 β	F	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	R	AAG GTC CAC GGG AAA GAC AC
IL-6	F	CCT ACC CCA ATT TCC AAT GC
	R	CGC ACT AGG TTT GCC GAG TA
IL-17	F	AAC CAA AAC CAG GGC ATT TC
	R	GAT TTC TTG CTG AAT GGC GA
TNF- α	F	CTA CTC CTC AGA GCC CCC AG
	R	AGG CAA CCT GAC CAC TCT CC

12. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성

RAW 264.7 세포주 세포 생존율을 측정된 결과, 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때 GK 투여군 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $110.7 \pm 4.8\%$, $108.1 \pm 1.6\%$, $101.8 \pm 3.7\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

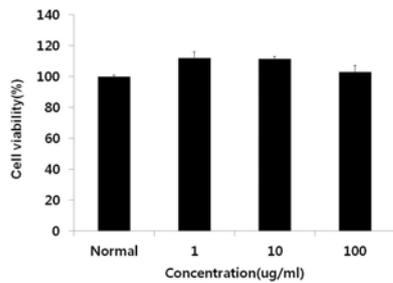


Fig. 1. Cell viability of GK extracts in RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D.

2. 세포 내 cytokine 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포 내 IL-1 β 생성량은 대조군이 28.6 \pm 1.7 pg/ml을 나타낸 반면, GK는 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 29.1 \pm 3.4 pg/ml, 25.8 \pm 2.7 pg/ml, 14.8 \pm 3.0 pg/ml로 나타났으며, IL-6 생성량은 대조군이 4347.0 \pm 233.4 pg/ml를 나타낸 반면, GK는 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 3151.8 \pm 578.3 pg/ml, 2096.5 \pm 130.0 pg/ml, 1137.5 \pm 173.5 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 10, 100 (μ g/ml)의 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다. IL-17 생성량은 대조군이 20.7 \pm 2.6 pg/ml을 나타낸 반면, GK는 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 13.9 \pm 1.1 pg/ml, 12.4 \pm 3.0 pg/ml, 13.1 \pm 1.9 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 1, 10, 100 (μ g/ml)에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타냈으며, TNF- α 생성량은 대조군이 5449.8 \pm 466.2 pg/ml를 나타낸 반면, GK는 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 4190.5 \pm 543.9 pg/ml, 3966.6 \pm 502.4 pg/ml, 3653.5 \pm 518.1 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 10, 100 (μ g/ml)의 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

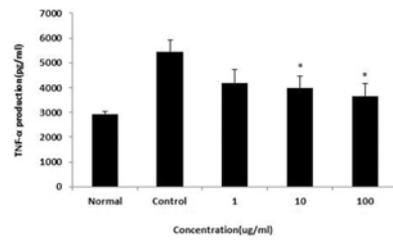
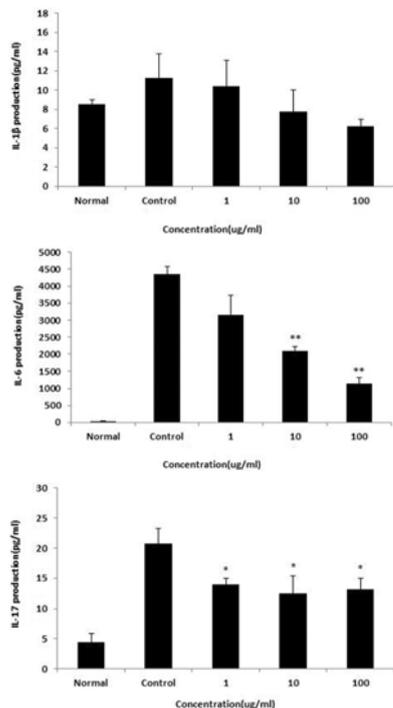


Fig. 2. Effects of GK on the level of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

3. 육안적 관찰 및 Rheumatoid Arthritis Index(AI) 측정

2차 유발 이후부터 실험 종료까지 2주 간격으로 관찰 및 RA 지수를 확인한 결과, 육안적 관찰 시 대조군은 발 (paw)과 발목 및 마디 등에 부종이 지속되는 반면, GK 그룹은 점차 감소되어 13주차에 대조군에 비하여 큰 감소를 나타내었다(Fig. 3).

RA 지수를 측정한 결과에서도 GK 투여군은 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

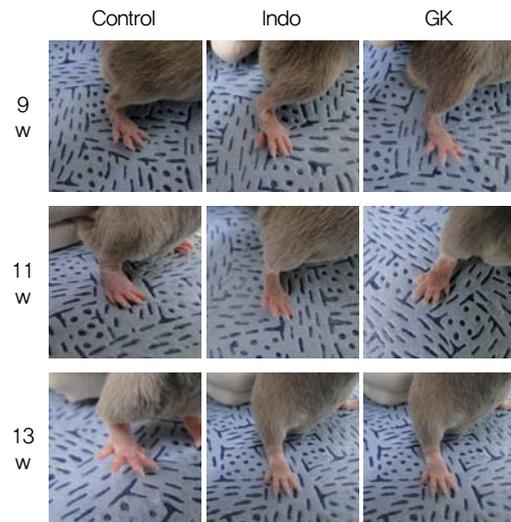


Fig. 3. Comparison of Rheumatoid Arthritis manifestation in DBA/1 mice between control and experimental group.

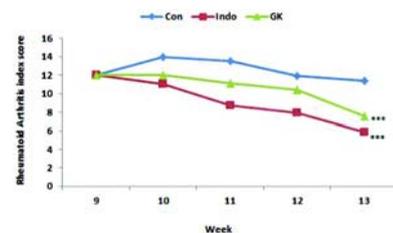


Fig. 4. Effects of GK on Rheumatoid Arthritis index score in CIA-induced DBA/1 mice (Significance of results, *** : $p < 0.001$).

4. 혈청 내 cytokine에 미치는 영향

GK 투여 종료 후에 혈청 내 cytokine을 측정한 결과, IL-1 β 는 대조군이 755.0 \pm 68.4 pg/ml을 나타낸 반면, GK는 523.1 \pm 49.7 pg/ml 으로 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감

소를 나타냈으며, IL-6는 대조군이 675.9 ± 107.5 pg/ml를 나타낸 반면, GK는 440.9 ± 99.0 pg/ml로 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다. IL-17은 대조군이 13.4 ± 1.3 pg/ml를 나타낸 반면, GK는 10.7 ± 1.2 pg/ml로 나타나 대조군에 감소를 나타냈으며, TNF- α 는 대조군이 274.4 ± 37.2 pg/ml를 나타낸 반면, GK는 117.3 ± 36.3 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (* : $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

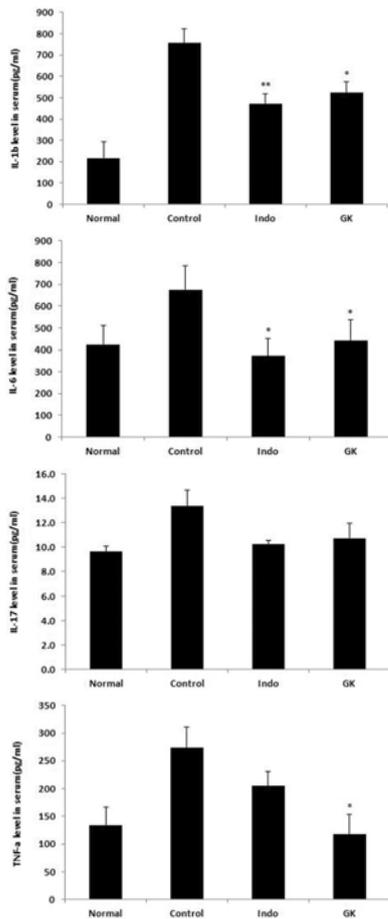


Fig. 5. Effect of GK on the level of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in the serum of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice (Significance of results, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

5. 비장조직에서 RA 인자의 발현량 측정

GK 투여 종료 후에 비장 조직에서 유전자 발현량을 측정한 결과, IL-1 β 는 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타내었을 때 GK 투여군은 $43.9 \pm 4.7\%$ 로 나타나, 대조군에 비하여 감소를 나타내었으며, IL-6는 대조군을 $100.0 \pm 1.1\%$ 로 나타내었을 때 GK 투여군은 $38.7 \pm 5.0\%$, IL-17은 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타내었을 때 GK 투여군은 $75.5 \pm 5.6\%$, TNF- α 는 대조군을 $100.0 \pm 1.2\%$ 로 나타내었을 때 GK 투여군은 $47.8 \pm 3.3\%$ 로 나타나, 모든 유전자 발현량이 대조군에 비하여 감소를 나타내었다.(Fig. 6).

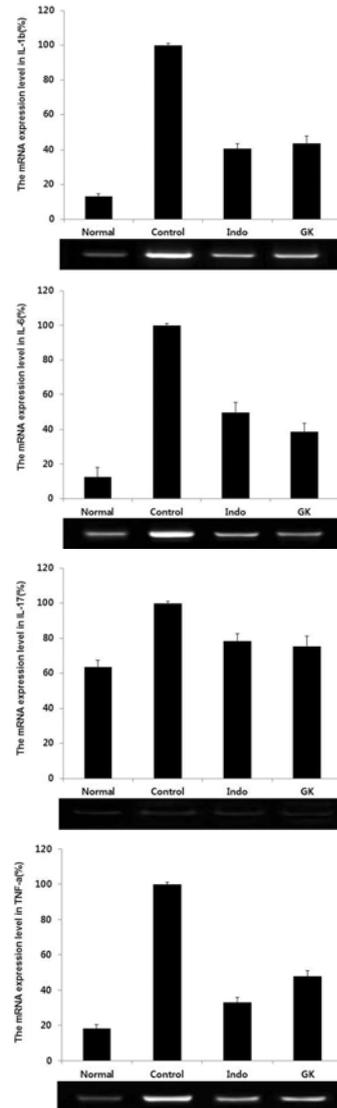


Fig. 6. The level of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α mRNA in spleen from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean \pm S.D.

6. 혈액 내 hs-CRP 검사

GK 투여 종료 후에 혈액 내 hs-CRP 검사를 실시한 결과, 대조군이 0.87 ± 0.06 mg/L에 비하여 GK 투여군은 0.37 ± 0.06 mg/L로 나타나 대조군에 비하여 모두 감소를 나타내었다(Fig. 7).

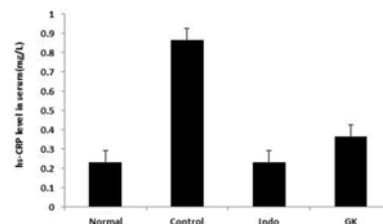


Fig. 7. Effects of GK on the level of hs-CRP in the serum of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were represent the mean \pm S.D.

고찰

한의학에서 류마티스성 관절염은 '痺證'의 범주에 속하는 것으로 인식되고 있는데¹⁸⁾, 특히 관절의 痺證은 風寒濕熱의 邪氣가 인체가 虛弱한 틈을 타서 인체의 經絡을 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣의 운행을 막아 筋骨, 關節, 筋肉에 疼痛, 腫脹, 變形 등을 초래하는 병증으로 정의되고 있다¹⁹⁻²¹⁾.

본 연구에서 사용한 加味桂芍知母湯(GK)은 歷節風에 사용되는 처방인 桂芍知母湯¹⁴⁾에 川烏頭, 牛膝, 威靈仙을 가미한 처방으로 현재 RA에 대한 急慢性 치료로 임상에서 사용되고 있다. 특히, 박¹⁵⁾ 등은 구성 약물 중 牛膝이 콜라겐 유도 관절염 생쥐에 대한 개선 효과를 보고한 바 있으며, 이¹⁶⁾ 등은 威靈仙藥鍼이 Collagen, Adjuvant, LPS 및 PLA2 유발 류마티스성 관절염에 미치는 영향을 보고한 바 있고, 최¹⁷⁾ 등은 歷節病에 관한 연구에서 RA에 대한 烏頭의 효능을 보고한 바 있다.

우선, 세포독성 평가를 실시한 결과, GK가 모든 실험 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었다.

RA는 크게 두 단계로 이루어진 여러 병리적 발생 기전을 거쳐 진행된다. 초기 단계에는 관절 구성 성분에 대한 자가 면역성을 확립하여 결국 관절 조직 파괴적인 면역 반응으로 발전하게 된다. 말초 림프 조직(peripheral lymphnode)에서 T 세포가 자가 항원을 제시하는 항원제시세포(APC, antigen presenting cell)를 인식하여 반응하면 Th1세포로 분화하고 관절 내로 모여들게 된다. 이 Th1세포는 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 와 같은 염증성 cytokine 및 chemokine을 분비하여 대식세포(macrophage), 호중성구(neutrophil)과 같은 염증성 세포들을 유인하는 동시에 활성을 높여줌으로서 자가 면역 반응을 진행 한다^{1,22)}. 다음 단계에는 관절 내 침투한 다양한 세포와 관절에 존재하는 활액세포(synovial cell)에 의해 생산되어지는 염증성 cytokine이 관절 및 골조직의 파괴에 중요한 역할을 담당 한다²³⁾. 이러한 과정을 거쳐 류마티스 활막은 활성화된 림프구, 대식세포 등의 세포가 생산하는 분비물이 존재하게 됨으로써, cytokine의 국소적인 생산물이 RA의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 인식되고 있다²⁴⁾. RA 조직에서 cytokine mRNA와 protein을 측정해 보면 모든 환자에서 IL-1, IL-6, TNF- α 등과 같은 pro inflammatory cytokine이 풍부한 것으로 보고²⁵⁾되었으며, 최근 많은 연구 결과들을 통해 RA의 핵심적인 기전이라 알려진 Th17 세포 분화의 대표적인 IL-17이 관절 내 세포들(대식세포, 활막세포, 연골세포)로부터 TNF- α , IL-1 같은 주요 cytokine과 IL-6, IL-8 등의 단백질 분해 효소 등의 분비를 유도 하여 RA를 더욱 심화시키는 것으로 보고되었다²⁾.

따라서 본 실험에서는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 LPS로 자극된 세포에 GK를 처리하여 염증성 cytokine을 확인한 결과, 대조군에 비하여 GK 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 의 감소를 확인하여 GK가 대식세포에서 RA의 대표적인 cytokine에 효과가 있다는 실험 결과를 바탕으로 *in-vivo* 실험을 위해 DBA/1 마우스에 CIA를 통해 RA를 유발하여 5주간 GK를 200 μl (200 mg/kg) 씩 경구 투여하였다.

RA 환자에서 혈중 IL-1 β 의 농도와 ESR, 통증의 강도와 비례하고²⁶⁾ 관절파괴와도 연관이 있음이 알려졌다²⁷⁾. 또한 IL-1

β 가 RA 환자의 활액 내에서 높게 검출되고²⁸⁾ IL-1 Ra로 치료한 RA 환자에서 관절 파괴가 억제되고 활막조직의 염증 세포 침윤도 감소함을 보여 IL-1이 RA에서 중요한 역할을 함이 증명되었다²⁹⁾. 본 실험에서 혈청 내 IL-1 β cytokine은 대조군에 비하여 GK 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

IL-6은 염증 반응시 분비되는 친염증성 cytokine으로, helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되어 면역반응, 조혈, 염증을 조절 한다³⁰⁾. RA 환자의 활액 및 혈청에서 IL-6의 수치가 증가되어 IL-6가 RA의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{31,32)}. 본 실험에서 혈청 내 IL-6 cytokine은 대조군에 비하여 GK 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

IL-17은 Th17 세포에서 생성되는 cytokine으로 다발성 경화증 등의 자가면역 질환의 병인에 중요한 역할을 하며, IL-17은 관절의 염증과 뼈 및 연골의 파괴를 증가시키며, 항IL-17 항체를 이용한 IL-17의 차단은 관절염증 및 파괴를 억제한다고 알려져 있다^{33,34)}. 본 실험에서 혈청 내 IL-17 cytokine은 대조군에 비하여 GK 투여군에서 감소를 나타내었다.

TNF- α 는 중요한 염증성 전구 cytokine으로서, RA에 환자에서 수치가 증가하며, 항체나 용해성 TNF- α 수용체 융합단백을 이용하여 차단하면 RA가 호전되는 까닭에 현재 양방에서 주로 사용되어 지는 치료약물이다. 주로 자극된 대식세포에서 분비되어 급성 염증반응에서 주요 역할을 한다. 또한, IL-1과 유사한 기능으로 서로의 생산을 유도하고, 생체 내에서 상승작용을 일으킨다고 보고 되어있다³⁵⁾. 본 실험에서 혈청 내 TNF- α cytokine은 대조군에 비하여 GK 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

비장은 오른쪽 복강 상부에 위치한 커다란 알 모양의 2차 면역기관으로 혈액 내 항원에 대한 면역반응을 시작하는데 중대한 역할을 한다. 림프절은 국소 조직으로부터 유입되는 항원을 포획하는데 전문화되어 있는 반면, 비장은 혈액을 여과하기 때문에 이 과정에 혈액 내 항원을 포획하는데 전문화되어 있다고 할 수 있다³⁶⁻³⁸⁾. 본 실험에서는 비장 조직에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 종료 후 비장 조직을 적출하여 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 에서 대조군에 비하여 GK 투여군에서 감소를 나타내었다.

위의 결과를 종합해 볼 때, RA의 대표적인 cytokine으로 알려진 IL-1 β , IL-6, IL-17 및 TNF- α 에서 LPS로 유도한 대식세포를 통한 연구 결과와 혈청을 통한 연구 결과가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소한 점과 비장조직에서의 유전자 발현량의 결과들이 부합됨으로써 GK가 RA에 효과가 있는 것으로 나타났다.

마지막으로 RA 환자들은 CRP 수치가 상승하게 된다. CRP(반응성단백)는 대표적인 급성기 반응물질로 염증이거나 조직 손상에 반응하여 양이 증가하거나 감소하게 되는데, 이러한 이유로 CRP는 급성기 반응물질이라 불리는 여러 단백질 중 하나이며 여러 감염질환 및 자가면역질환과 관련된 염증의 변화를 감시하는데 사용된다³⁹⁾. 또한, CRP는 RA에서의 혈청 내 IL-6의 농도와 서로 연관되어 있다⁴⁰⁾. hs-CRP 검사는 표준 CRP 검사보다 낮은 농도의 해당 단백질을 더 정확히 검출할 수 있는 측정 방법이다³⁹⁾. 본 실험에서 hs-CRP 혈액 검사를 실시 한 결과, GK 투여군은 대조군에 비하여 hs-CRP

수치가 감소하였다.

이상의 in vitro와 in vivo 결과는 加味桂芍知母湯이 RA의 대표적인 인자들의 효과적인 감소를 통해 RA 치료제로서의 가능성이 있다고 사료된다. 다만 생리활성을 나타내는 화학성분에 대한 연구와 더불어 활성화기전에 대한 분석이 미흡했던 점은 아쉬운 점으로 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 류마티스 관절염을 유발한 마우스에서 현재 임상에서 사용되고 있는 加味桂芍知母湯(GK)의 류마티스 관절염에 대한 효능 및 기전을 객관적으로 검증하기 위하여, LPS로 활성화된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 세포독성 및 cytokine에 미치는 영향과 동물병태 모델에서 육안적 평가, 혈청 내 cytokine 및 비장에서의 mRNA 발현량, 혈청 내 hs-CRP 검사를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GK는 RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성 평가에서 대조군에 비하여 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. GK는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에 대한 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 의 생성을 대조군에 비하여 감소시켰다.
3. GK 투여군은 육안적 평가 및 류마티스 관절염 지수 평가에서 13주차에 유의성 있게 감소시켰다.
4. GK 투여군은 대조군에 비하여 혈청 내 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 발현을 각각 31%, 35%, 20%, 57%로 감소시켰다.
5. GK 투여군은 대조군에 비하여 비장 조직에서의 IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α 유전자 발현을 각각 46%, 51%, 25%, 42%로 감소시켰다.
6. GK 투여군은 대조군에 비하여 혈액 내 hs-CRP 비율을 58%로 감소시켰다.

이상의 결과들로 보아 加味桂芍知母湯는 류마티스 관절염의 주요 인자들을 감소 효능이 실험적으로 규명되었다. 보다 구체적인 치료 기전은 항 후 보다 심도있는 연구를 통하여 보완되어야 할 것으로 보이나 이와 같은 결과는 加味桂芍知母湯이 류마티스 관절염의 치료제로서 효과가 있으며, 추후 임상적으로 엄격한 기준을 충족한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신 센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Kim JM, Kim HY. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Korean Med Assoc. 2010 ; 53(10) : 853-61.
2. Song YW. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. Korean J Med. 2009 ; 76(1) : 1-6.
3. Kosmaczewska A, Swierkot J, Ciszak L, Wiland P. The role of Th1, Th17, and Treg cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis including anti-inflammatory action of Th1 cytokines. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2011 ; 65 : 397-403.
4. Maini RN, Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. Annu Rev Med. 2000 ; 51 : 207-29.
5. Van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis may require a concerted action of Th2 cytokines. Curr Opin Investig Drugs. 2002 ; 3(7) : 1011-6.
6. Ishida H. Clinical implication of IL-10 in patients with immune and inflammatory diseases. Rinsho Byori. 1994 ; 42(8) : 843-52.
7. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. Arthritis Rheum. 2010 ; 62(10) : 2876-85.
8. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. Autoimmun Rev. 2007 ; 6(3) : 169-75.
9. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. Arthritis Rheum. 2008 ; 58(3) : 875-87.
10. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14(1) : 397-440.
11. Matthew H, Kirk S. The anti inflammatory and antiviral effects of hydroxy chloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(1) : 157-61.
12. Song JS. Toward the cure of rheumatoid arthritis. Korean J Med. 2005 ; 69(6) : 581-9.
13. Ahn SH, Ki HH. Lonicerae Flos Inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS Induced Arthritis of Mouse through Regulation of MI. Korean J Orient Physiol Pathol. 2010 ; 24(2) : 242-8.
14. Zhang ZJ, Jin kui yao lue fang lun, Tai bei : Tai lian guo feng chu ban she. 1973 : 32-3.
15. Park YK, Kim CS. The therapeutic effect of

- Achyranthis Radix on the collagen-induced arthritis in mice. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(4) : 129-35.
16. Lee JS, Kim KH, Lee SD, Kim KS. The Effect of Clematidis Radix Herbal-acupuncture Solution, on Collagen, Adjuvant, Lipopolysaccharide and Phospholipase A2 Induced Rheumatoid Arthritis in Mice. *J Korean Acup Moxibustion Soc*. 2012 ; 29(1) : 127-37.
 17. Choi HS, Kwon OS, Lee JH, Kang YH. The literatural study on ryuk-jeol disease. *The J DongGuk Orient Med*. 1996 ; 5(1) : 97-129.
 18. Heo J. *DongEuiBoGam*. Seoul : BukKyongDang. 1983 : 378.
 19. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine. *Oriental Rehabilitation Medicine*. Seoul : Gunja. 2005 : 83-4.
 20. Kim HY. The Efficacious Mitigation of Rheumatoid Arthritis by Immune Suppression of JeEoTang. *Kor J Herbology*. 2003 ; 18(3) : 211-22.
 21. Jung JK, Son KH, Kim YS, Park YK. Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice. *Kor J Herbology*. 2011 ; 26(3) : 1-6.
 22. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of auto immunity. *Life Sci*. 1997 ; 61(19) : 1861-78.
 23. Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. *Tripterygium wilfordii* Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor- κ B activities. *Mol Pharmacol*. 2001 ; 59(5) : 1196-205.
 24. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 ; 38(2) : 151-60.
 25. Zangerle PF, De Groote D, Lopez M, J. Meuleman RJ, Vrindts Y, Fauchet F, Franchimont P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood: II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cytokine*. 1992 ; 4(6) : 568-75.
 26. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1988 ; 332(8613) : 706-9.
 27. North J, Situnayake RD, Tikly M. Interleukin 1beta, hand and foot bone mineral content and the development of joint erosions in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994 ; 53(8) : 543-6.
 28. Fong KY, Boey ML, Koh WH, Feng PH. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. *Clin Exp Rheumatol*. 1994 ; 12(1) : 55-8.
 29. Cunnane G, Madigan A, Murphy E, FitzGerald O, Bresnihan B. The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 ; 40(1) : 62-9.
 30. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2010 ; 23(1) : 118-34.
 31. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*. 1988 ; 31(6) : 784-8.
 32. Hirano T, Matsuda T, Turner M. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 1988 ; 18(11) : 1797-801.
 33. Chevrel G, Page G, Granet C, Streichenberger N, Varennes A, Miossec P. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 β on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J Neuroimmunol*. 2003 ; 137(1) : 125-33.
 34. Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum*. 2004 ; 50(1) : 199-208.
 35. Lee GS, Pena ID, Choi JY, Yoon SY, Choi JH, Kang TJ, Oh SK, Cheong JH. Effect of SPZZC, a composition of herb extracts, on atopic dermatitis in BALB/c and NC/Nga mouse. *Yakhak Hoeji*. 2008 ; 52(3) : 232-39.
 36. Ha JC, Kim HD, Joo JW, Kim JO. Ultrastructural Localization of Antigenic Sites on *Vibrio vulnificus* and BALB/c Spleen Cells Applying the Protein A-Gold Technique. *J Korean Soc Microbiol*. 1989 ; 24(4) : 391-7.
 37. Chung HT, Ha TY, Cung DK. Histological changes of mouse spleen and lymph node by cyclophosphamide. *J Korean Soc Microbiol*. 1978 ; 10 : 55-62.
 38. Lee BG, Chu MK, Chung HK, Kim JD. Effect of Adaptagen- α on the Mouse Peritoneal Macrophages and Spleen Cells in Vivo. *J Korean Soc Microbiol*. 1978 ; 29(5) : 507-15.
 39. Yeo HJ, Lee JH, Lee HJ, Byun KS, Im HJ, Kim MJ. Microvascular Findings in Patients with Rheumatoid Arthritis - Assessed, Using Fundus Photography and Fluorescein Angiography. *J*

Rheum Dis, 2013 ; 20(4) : 231-7.

40. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann Rheum Dis, 1993 ; 52(3) : 232-4.