

疏風活血湯加味方이 collagen으로 誘發된 생쥐의 關節炎 억제에 관한 연구

곽중문 · 오민석 · 박종오¹ · 김동희^{1*}

대전대학교 한의과대학 재활의학교실, 1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실

A Study on the Effects of Sopunghwalhyeoltang-gamibang on the Inhibition of Arthritis Induced by Collagen on the Mouse

Jung Mun Gwak, Min Suck Oh, Jong Ho Park¹, Dong Hee Kim^{1*}

Department of Oriental Rehabilitation, College of Oriental Medicine, Daejeon University

¹: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was carried out to know the effects of sopunghwalhyeoltang-gamibang(hereinafter referred to SPHHT) on the inhibition of arthritis induced by collagen on the mouse. Various experimental were performed in vivo (in DBA/1J mice which are experimental model of arthritis induced by collagen) to analyse the immunomodulatory effects of SPHHT. The results were obtained as follows : 1. The cytotoxicity against mLFC was not measured in all concentration. 2. The arthritis index, incidence, hind paw edema, delayed-type hypersensitivity reaction, spleen weight were reduced in SPHHT treated group. 3. The expression of CD3ε+/CD4+, CD3ε+/CD8+ and CD19+ in peripheral blood mononuclear were reduced in SPHHT treated group. 4. The production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF-α were significantly reduced in SPHHT treated group. 5. The formation of new bones and synivium were stimulated in SPHHT treated group. Comparison of the results for this study showed that Sopunghwalhyeoltang-gamibang had immunomodulatory effects. So we expect that Sopunghwalhyeoltang-gamibang should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease. Therefore we have to survey continuously in looking for the effective substance and mechanism in the future.

Key words : Sopunghwalhyeoltang-gamibang(疏風活血湯加味方), arthritis, immunomodulation, cytokine, histopathology

서론

류마토이드 관절염은 만성관절염 중 骨關節炎 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환으로, 관절내의 滑膜, 軟骨과 周圍 組織의 炎症 反應을 병변으로 하며 관절 이외에도 여러 臟器를 침범하는 慢性 全身性 炎症疾患¹⁾이다. 한의학에서 류마토이드 관절염은 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺, 痺症 등의 범주에 속한다^{2,3)}고 볼 수 있는데, 대부분 인체의 正氣가 虛한 상태에서 肌肉 經絡이 風·寒·濕 邪氣의 침범으로 氣血 運行이 不暢하게 되어 발생하며, 치료법으로는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡 및 滋補肝腎法 등^{2,5)}이 활용되고 있다. 疏風活血湯은 沈⁶⁾의

《沈氏尊生書》에 “或由風濕與痰, 與死血, 致走注刺痛, 其痛處或腫或紅, 則必宜邪通氣, 宜疏風活血湯”이라記載된 이후, 《東醫寶鑑》⁷⁾과 《證脈方藥合編》⁸⁾에 “治四肢百節流注刺痛, 皆是風濕痰死血所致, 其痛處或腫或紅”이라 하여 주로 疼痛을 동반한 관절염에 다용되는 처방이다. 疏風活血湯에 대한 실험적 연구로 윤⁹⁾은 腎臟 기능 조절작용을, 양¹⁰⁾은 神經毒性 방어작용을, 남¹¹⁾은 관절염에 대한 消炎, 鎮痛 작용을, 안¹²⁾은 류마토이드 관절염에 대한 혈액학적 유의성을 각각 보고한 바가 있으나, 疎風活血湯加味方의 면역 조절작용을 중심으로 한 抗關節炎 작용에 관한 연구는 아직 접하지 못하였다. 이에 저자는 류마토이드 관절염이 自家免疫疾患임에 착안하여, 疎風活血湯에 祛風濕하는 秦朮¹³⁾과 滋陰潛陽하는 龜板¹³⁾을 가미한 疏風活血湯加味方의 면역 조절작용을 실험적으로 규명하고자 DBA/1J 생쥐의 collagen induced arthritis (CIA)에 대한 arthritis index와 incidence, hind paw 浮

* 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학
E-mail : dhkim@dju.ac.kr Tel : 042-280-2623
· 접수: 2002/06/18 · 수정: 2002/07/29 · 채택 : 2002/08/07

腫, 遲延型過敏反應(DTH), 脾臟 무게, CD3 ϵ + /CD4+, CD3 ϵ + /CD8+, CD19+ 발현, IL-6, TNF- α 의 分泌量 및 組織學的 變化 등을 관찰한 결과 유의성있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물

실험 동물은 한국화학연구소에서 구입한 4주령의 雌性 BALB/C와 Charles River(Japan)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 1日中 12 시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(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 疏風活血湯加味方의 처방 구성 및 용량은 대전대학교 부속한방병원 처방집¹⁴⁾에 準하였으며, 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table. 1. Prescription of Sopunghalhyultang-gamibang(SPHHT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	.
威靈仙	Clendidis Radix	.
白芷	Angelicae davuricae Radix	.
防己	Sinomenii Radix	.
黃柏	Phellodendri Cortex	.
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	.
南星	Arisaematis Rhizoma	.
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	.
羌活	Angelicae koreande Radix	.
桂皮	Cinnamomi Cortex	.
紅花	Carthami Flos	1.2
秦艽	Lycocotoni Radix	6
龜板	Testudinis Carapax	4
生薑	Zizyphi inermis Fructus	20
Total amount		75.2

3. 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), methotrexate (MTX), 3-4,5-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), collagen typeIV, complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 赤血球溶血液 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂) 등은 Sigma 사 (USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기는 rotary evaporator(BUCHI B-480,

Switzerland), ELISA Leader (Molecular devices, U.S.A), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), digital thickness gauge (Digimatic indicator IDC543-107FB, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan), 원심분리기(Centrifuge, Sigma, U.S.A), bio-freezer (Sanyo, Japan), ice-maker (Vision, Korea), flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A.) 등을 사용하였다.

4. 疏風活血湯加味方(SPHHT) 추출물 분리

SPHHT 3첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml을 가하여 熱湯 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여, 이를 減壓 蒸溜裝置(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축한 후 이를 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 SPHHT를 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

5. mLFC 배양 및 細胞毒性 측정

mLFC는 BALB/c 생쥐의 폐조직을 차가운 D-PBS로 3회 세척하고, 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)과 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM- 10 % FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2 % EDTA로 mLFC를 분리하여 DMEM-5 % FBS 배양액에 105 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다. 細胞毒性 측정은 SRB assay¹⁵⁾를 변형하여 사용하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0 \times 10⁴개의 세포를 96 well plate에 분주한 후 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 이후 SPHHT 추출물(최종 농도 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μ l를 가하고 1 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 여기에 SRB(0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색한 후 0.1 % acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 μ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, USA) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Collagen (CII) 접종과 SPHHT 투여¹⁶⁾

CII는 접종은 DBA/1J 생쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군(methotrexate, MTX, 1.0 mg/kg, i.p), SPHHT

투여군 (10 % 0.1 ml /animal/day) 등 3개 실험군으로 나누었다. MTX는 CII 1차 (0 day)와 2차 (21 day) 접종할 때 2회 복강에 주사하였고 SPHHT는 CII 1차 접종 후 5주일(35일) 간 1일 1회씩 경구투여하였다.

7. Arthritis index(AI) and incidence 분석¹⁷⁾

2차 CII 접종 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 아래의 기준으로 발병률(incidence, %)을 결정하였다. 0 = no arthritis, 1 = small degree of arthritis, 2 = light swelling, 3 = medium swelling, 4 = severe swelling, 5 = severe swelling and non-weight-bearing, 그리고 CIA 유발 정도를 1 주일 간격으로 기록하였다.

8. 뒷다리 Paw Edema 측정

CII 접종 전후에 뒷다리의 부종치를 digital thickness gauge (Digimatic indicator IDC543-107FB, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan)로 왼쪽과 오른쪽 같은 부위를 2회 측정한 후 평균치를 사용하였다. 부종치는 뒷다리 두께(paw Th., mm)로 표현하였다.

9. 지연성과민반응(Delayed-Type Hypersensitivity reaction) 측정¹⁸⁾

1차 CII 접종 후 49일째에 실험을 종료하고, 오른쪽 귀(ear)의 두께를 digital thickness gauge로 측정하였다. CII (0.4 mg/ml) 25 µl를 D-PBS에 녹인 후 오른쪽 귀의 피내에 주사하였다. 24시간 후 같은 부위의 오른쪽 귀의 두께를 측정하였다.

10. 비장 무게 변화 측정

1차 CII 접종 후 49일째에 실험을 종료한 후 비장 무게를 측정하였다.

11. CD4+, CD8+, CD19+ cell 분석

DBA/1J에서 분리한 비장세포에 적혈구 용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 °C에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 CD4+, CD8+, CD19+ 세포를 분석하였다.

12. ELISA에 의한 cytokine 측정

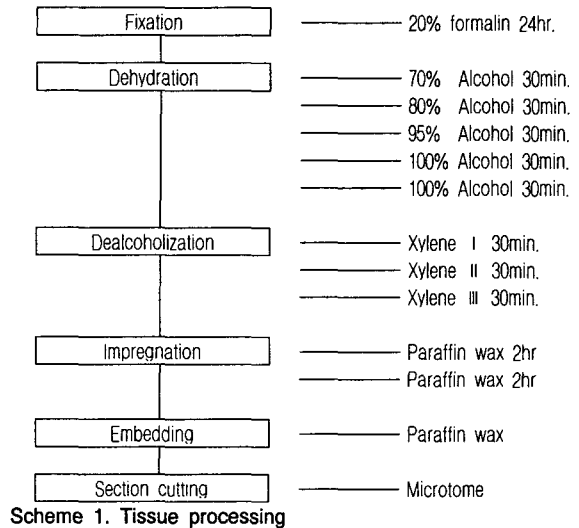
혈청중 IL-6 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)와 TNF-α는 ELISA kit(R&D system)으로 생산량을 측정하였다.

13. 병리조직학적 검사

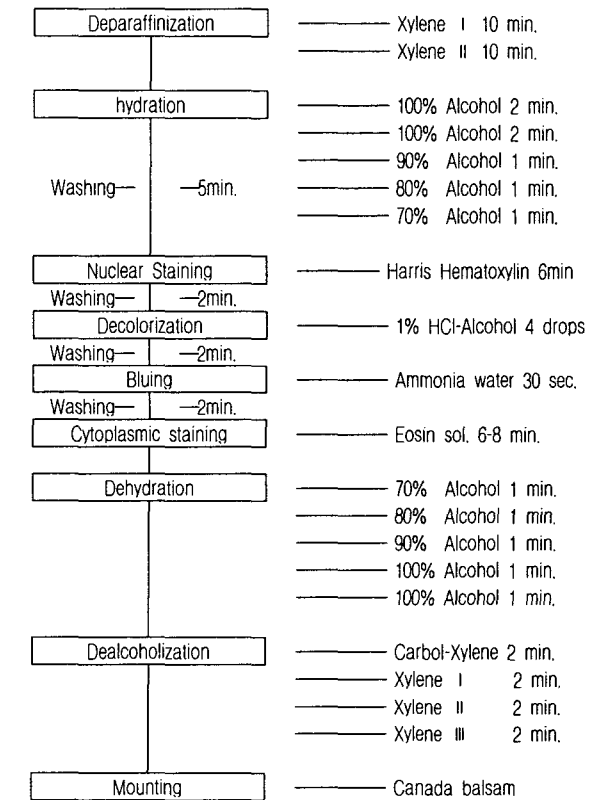
40일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10 % formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, 아래의 scheme 1과 같은 과정을 거쳐 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다.

14. 통계 처리

실험결과는 mean ± standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.



Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

성 적

1. mLFC에 대한 細胞毒性

mLFC에서는 대조군의 세포생존율이 100 ± 5.4%인데 비하여, SPHHT 200 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 투여군에서는 각각 98.5 ± 4.2(%), 91.6 ± 3.4(%), 107.6 ± 4.3(%), 85.9 ± 4.7%로 세포독성이 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Cytotoxicity Effects of SPHHT on mLFC

Drugs	Dose (μg/ml)	Percent of control data(%)
Control	0	100.0±5.4
	1	85.9±4.7
SPHHT	10	107.6±4.3
	100	91.5±3.4
	200	98.5±4.2

2. 발병 억제효과

대조군은 28일째 CIA가 나타나 49일째 모든 실험동물에서 관절염 병태가 진행되었다. 이에 반해 MTX 투여군은 35일째 CIA가 발병하였고, 대조군이 100 % 발병한 49일째는 11 %의 발병률을 나타내어 억제 효과를 나타내었다. SPHHT 투여군은 28일째 20 % 발병률을 시작으로, 56일째 68 %의 발병률을 나타내어, MTX 투여군에 비하여 유의성있는 억제효과는 나타나지 않았으나, 대조군에 비하여서는 56일째 30% 이상의 발병 억제효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Prophylactic Effects of SPHHT and MTX on the Arthritis Incidence of Murine Collagen-induced Arthritis (CIA)

Day	Incidence(%)		
	Control	MTX	SPHHT
0	0	0	0
7	0	0	0
14	0	0	0
21	0	0	0
28	15	0	20
35	58	5	34
42	90	7	61
49	100	11	65
56	100	15	68

DBA/1J mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 10 mice were oral administered with 0.1ml of SPHHT (300 mg/kg) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1 mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. Incidence (%) was measured observing the severity of Arthritis in the metacarpophalangeal wrist, metatarsophalangeal. Mice showing an AI of 1 or more were considered to have arthritis, and the incidence of CIA was recorded. Each point represents the mean of 10 mice.

3. Hind Paw 부종 억제효과

MTX 투여군은 21일째부터 대조군에 비하여 유의성있는 감소(P<0.001)를 나타내었고, SPHHT 투여군은 14일째부터 유의성있는 감소(P<0.05)를 나타내었다(Table 4).

Table 4. Prophylactic Effects of SPHHT and MTX on the Hind Paw Thickness in Murine CIA.

Day	Hind paw Th.(mm)		
	Control	MTX	SPHHT
0	1.52±0.01	1.50±0.01	1.51±0.01
7	1.56±0.01	1.54±0.01	1.53±0.01
14	1.62±0.01	1.62±0.01	1.60±0.01*
21	1.75±0.01	1.64±0.01***	1.65±0.02***
28	1.95±0.01	1.70±0.01***	1.67±0.01***
35	2.15±0.02	1.71±0.02***	1.72±0.03***
42	2.37±0.01	1.73±0.01***	1.74±0.02***
49	2.45±0.02	1.72±0.03***	1.84±0.02***
56	2.49±0.02	1.74±0.02***	1.89±0.01***

4. 관절염 지표에 미치는 효과

실험 종료 후 평가한 관절염 지표에서는 대조군이 7.4±0.4인데 비하여, MTX 투여군은 0.32±0.24로 유의성있는 감소(p<0.001)를 나타내었고, SPHHT 투여군 역시 3.6±0.42로 유의성있는 감소(p<0.001)를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effects of SPHHT and MTX on the Arthritis Index in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Arthritis Index (AI)	Inhibition (%)
Control		10	7.4±0.4	
MTX	1mg/kg	10	0.32±0.24***	95.7
SPHHT	300mg/kg	10	3.6±0.42***	51.4

5. 지연형 과민반응에 미치는 효과

지연형 과민반응에서는 정상군이 0.01±0.002(mm)인데 비하여, 대조군은 0.29±0.03(mm)으로 큰 폭으로 증가하였다. 이에 비해 MTX 투여군은 0.13±0.03(mm)으로 유의성있는 감소(p<0.001)를 나타내었고, SPHHT 투여군 역시 0.22±0.01(mm)으로 대조군에 비하여 유의성있는 감소(p<0.05)를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effects of SPHHT and MTX on Delayed Type Hypersensitivity Skin Reaction in Murine CIA

Drugs	Dosage	N	Increase in ear Thickness(mm)	Inhibition (%)
Normal		10	0.01±0.002	
Control		10	0.29±0.03	
MTX	10mg/kg	10	0.13±0.03***	55.2
SPHHT	300mg/kg	10	0.22±0.01*	24.1

6. 비장 무게 변화에 미치는 영향

정상군의 비장 무게는 131±3.0(mg)으로 나타난 반면, 대조군은 234±11.0(mg)으로 이상 증대되어 나타났고, MTX와 SPHHT 투여군은 각각 122±9.0(mg), 174±6.7(mg)로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의성있는 감소(p<0.001)를 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effects of SPHHT and MTX on Spleen Weight in Murine CIA

Drugs	Dosage	N	Change of spleen weight(mg)	Decrease (%)
Normal		10	131±3.0	
Control		10	234±11.0	
MTX	1mg/kg	10	122±9.0***	47.9
SPHHT	300mg/kg	10	174±6.7***	25.6

Table 8. Effects of SPHHT on the Expression of CD3ε and CD4 in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Murine CIA

Drugs	Dosage	N	CD3ε +/CD4+ (%)	Decrease (%)
Normal		10	12.5	
Control		10	16.2	
MTX	1mg/kg	10	9.2	43.2
SPHHT	300mg/kg	10	15.2	6.2

7. CD3ε+/CD4+ 발현에 미치는 영향

면역세포중 helper T cell(CD3ε+/CD4+)의 수는 정상군에서 12.5(%), 대조군에서 16.2(%로 나타난 반면, MTX 투여군은 9.2(%), SPHHT 투여군은 15.2(%로 대조군에 비하여 감소하였다 (Table 8, Fig. 1).

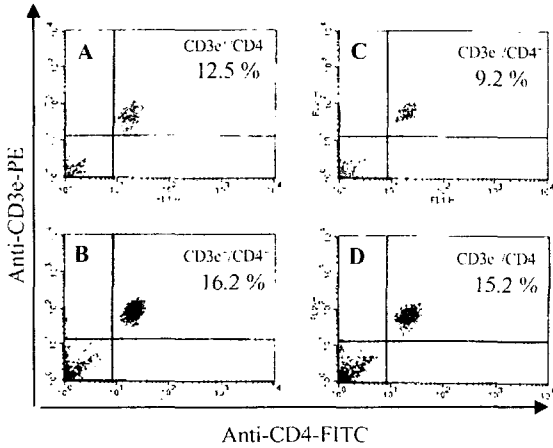


Fig. 1. Effects of SPHHT on the expression of CD3ε and CD4 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of murine CIA. DBA/1J mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 10 mice were oral administered with 0.1 ml of SPHHT (300 mg/kg) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1 mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD3ε-PE versus CD4-FITC. Normal: not treated, control : murine CIA, 1mg/ml MTX; SPHHT treatment group were stained with CD3ε-PE/CD4-FITC. Two group treated with SPHHT showed decreased number of CD3ε+/CD4+ T cells.

Table 9. Effects of SPHHT on the Expression of CD3ε and CD8 in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Murine CIA

Drugs	Dosage	N	CD3ε+/CD8+ (%)	Decrease (%)
Normal		10	2.89	
Control		10	5.37	
MTX	1mg/kg	10	1.98	63.1
SPHHT	300mg/kg	10	3.55	33.9

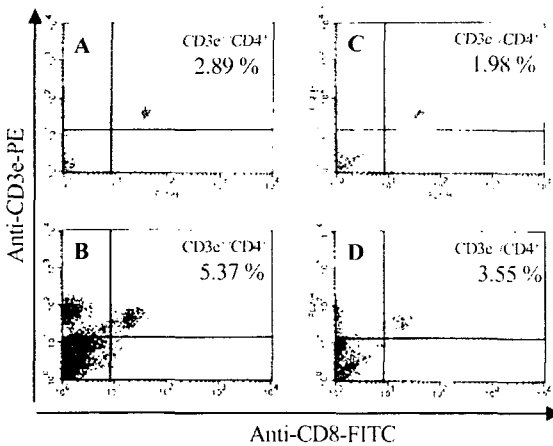


Fig. 2. Effects of SPHHT on the expression of CD3ε and CD8 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of murine CIA.

8. CD3ε+/CD8+ 발현에 미치는 영향

면역세포중 T cell(CD3ε+/CD8+)의 수는 정상군에서 2.89(%), 대조군에서 5.37(%로 나타난 반면, MTX 투여군은 1.98(%), SPHHT 투여군은 3.55(%로 대조군에 비하여 감소하였다 (Table 9, Fig. 2).

9. CD19+ 발현에 미치는 영향

면역세포중 CD19+ 수는 대조군에서 66.4(%로 나타난 반면, MTX 투여군은 53.5(%), SPHHT 투여군은 60.3(%로 대조군에 비하여 감소하였다 (Table 10, Fig. 3).

Table 10. Effects of SPHHT on the Expression of CD19 in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Murine CIA

Drugs	Dosage	N	CD19+ (%)	Decrease (%)
Control		10	66.4	
MTX	1mg/kg	10	53.5	19.4
SPHHT	300mg/kg	10	60.3	9.3

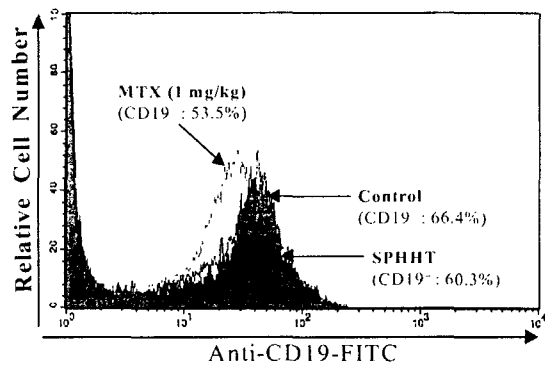


Fig. 3. Effects of SPHHT on the expression of CD19 B cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of Murine CIA. DBA/1J mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 10 mice were oral administered with 0.1 ml of SPHHT (300 mg/kg) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1 mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD19-FITC. Normal: not treated, control : murine CIA, 1mg/ml MTX; STT Aqua-Acupuncture solution on the Chok-Samni (S38) were stained with CD19-FITC. Two group treated with SPHHT showed decreased number of CD19+ B cells.

Table 11. Inhibitory Effect of SPHHT and MTX on the IL-6 Production in Murine CIA

Drugs	Dose (μg/ml)	IL-6 production (pg/ml)
DBA/1J normal	0	120±9.5
Murine CIA	Control	3120±579
	MTX	426±37.8***
	SPHHT	1668±159*

DBA/1J mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 10 mice were oral administered with 0.1 ml of SPHHT (300 mg/kg) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1 mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. The mice serum were collected after 56 day and IL-6 production in the serum was assay by ELISA kit. and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Normal: not treated, control : murine CIA, 1mg/ml MTX; SPHHT were analysis with IL-6 ELISA kit. Each point represents the mean± SE of 10 mice. Statistically significant value compared with control data by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

10. IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군이 120±9.5(pg/ml)인데 비하여, 대조군이 3120±579(pg/ml)로 큰 폭으로 증가하였고, MTX 투여군은 426±37.8(pg/ml)로 유의성있는 감소(p<0.001)를, SPHHT 투여군 역시 1668±159(pg/ml)로 대조군에 비하여 유의성있는 감소(p<0.05)를 나타내었다(Table 11).

11. TNF-α 생성량에 미치는 영향

TNF-α 생성량은 정상군이 47±5.8(pg/ml)인데 비하여, 대조군이 930±45.3(pg/ml)으로 큰 폭으로 증가하였고, MTX 투여군은 342±27.4(pg/ml)로, SPHHT 투여군은 415±24.8(pg/ml)로 대조군에 비하여 유의성있는 감소(p<0.001)를 나타내었다(Table 12).

Table 12. Inhibitory Effect of SPHHT and MTX on the TNF-α Production in Murine CIA

Drugs		Dose (μg/ml)	TNF-α production (pg/ml)
DBA/1J Normal		0	47±5.8
Murine CIA	Control	0	930±45.3
	MTX	1	342±27.4***
	SPHHT	300 mg/kg	415±24.8***

12. 조직학적 변화에 미치는 영향

40일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정된 후 세절하여 水洗한 다음 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다. 정상군 (A)은 pannus, synovium, bone의 구조로 경계가 뚜렷하고, 대조군 (B)에서는 invasion pannus, 관절내의 삼출물, 경계면의 파괴, 괴사된 연골 그리고 관절연골내에 비교적 감소된 proteoglycan 등 경계면이 불분명하게 보였으나 SPHHT 투여군 (C)은 새로운 bone과 synovium이 형성되며 정상구조와 유사한 변화를 보였다(Fig. 4).

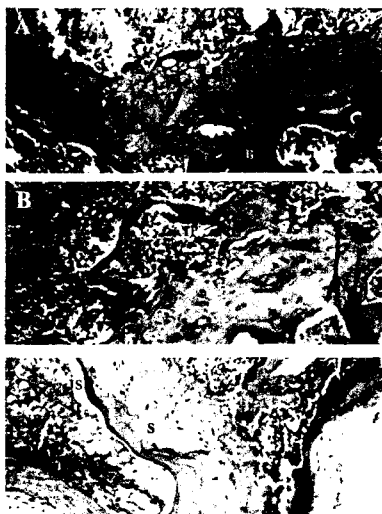


Fig. 4. Effect of SPHHT on the histopathology of joints of murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse (A), control: murine CIA (B), SPHHT extract treated (C). Intraarticular exudate, marginal erosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel (B and C). B, bone; CPJ, cartilage pannus junction; P, pannus; S, synovium; NB, new bone; IP, invasion pannus; JS, joint space, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: X 40.

고찰

임상적으로 관절염은 風濕性關節炎, 類風濕性關節炎 및 骨關節炎 등으로 구분되며, 류마티드 관절염은 만성관절염중 퇴행성 관절질환 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환¹²⁾으로, 원인 불명의 만성 전신성 다발 염증성 自家疾患이다. 주 증상으로는 滑液膜의 慢性 肥大 및 炎症으로 關節軟骨과 그 주위 조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 동통이 초래되며, 점차적으로 특징적인 관절 변형 및 강직이 유발된다¹⁹⁾. 류마티드 관절염의 병인과 병기는 유전적 감수성과 감염 등으로 추측되어 왔으나, 최근 면역학과 분자생물학의 발전으로 自家免疫 반응이 주 요인으로 주목 받고 있다²⁰⁾. 관절염은 한의학적으로 歷節風, 鶴膝風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 痛痺, 痺痛, 痺症, 風痺 및 痺證 등의 範疇²³⁾에 속한다고 볼 수 있다. 《素問·痺論》²¹⁾에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕 外邪가 痺證의 중요 원인이라고 언급했으며, 《金匱要略》²²⁾에서는 “短氣 自汗出 歷節疼 不可屈伸 此皆飲酒 汗出 當風所致”, 《藥氏諸病源候論》²³⁾에서는 “由人體虛 腠理開 故受風邪也”, 《外臺秘要方》²⁴⁾에서는 “白虎病者 大都是風寒暑濕之毒 因虛所致 攝攝失理受 此風邪 經脈結滯 血氣不行 畜於骨節之間 或在四肢”, 《三因方》²⁵⁾에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보아, 치료는 祛風, 散寒, 除濕을 중심으로 清熱, 化痰祛痰, 活血通絡 및 滋補肝腎 등의 방법^{2-5,22-25)}이 활용되고 있다. 본 시료의 기본방인 疏風活血湯은 沈⁶⁾의 《沈氏尊生書》에 “或由風濕與痰, 與死血, 致走注刺痛, 其痛處或腫或紅, 則必宜邪通氣, 宜疏風活血湯”이라記載되어 있고, 許⁷⁾의 《東醫寶鑑》에는 “治四肢百節流注刺痛, 皆是風濕痰死血所致, 其痛處或腫或紅”이라 하여 주로 痺證을 다스리는 처방으로 활용되어 왔다. 疏風活血湯에 대한 실험적 보고로 윤⁹⁾은 疏風活血湯이 요량 및 전해질 배설량의 증가와 신사구체 여과율을 증가시켜 신장 기능의 향상에 영향을 미친다고 하였고, 양¹⁰⁾은 酸素自由基 억제에 의한 神經毒性을 방어하는 효과가 있어 脊髓感覺神經細胞의 활성을 증가시키고 酸化的 손상을 억제함을 보고하였다. 또한 疏風活血湯의 관절염에 관한 실험적 보고로는 남¹¹⁾은 歷節風에서의 消炎, 鎮痛, 解熱 효과를 실험적으로 규명하였고, 안¹²⁾은 류마티드 관절염 환자에 대하여 ESR, CRP, RBC 등의 유의성있는 변화를 보고하였으며, 疏風活血湯 藥針을 이용하여 김²⁶⁾과 송²⁷⁾은 adjuvant 관절염에서 CRP, 血清中 總蛋白, globulin, albumin, antistreptolysin 등의 유의적인 변화를 보고하였다. 이와 같이 疏風活血湯이 관절염 치료에 임상적으로 입증된 바가 있으며, 실험적 연구로도 유의한 결과가 보고된 바가 있어, 본 연구에서는 기존의 疏風活血湯에 祛風濕하는 秦艽¹³⁾과 滋陰潛陽하는 龜板¹³⁾을 가미한 疏風活血湯加味方을 시료로 自家免疫의 병리 기전에 기초한 다양한 실험을 실시하였다. 먼저 관절염 실험에 앞서 실시한 본 시료의 mLFC에 대한 細胞毒性 평가에서는 모든 농도에서 細胞毒性이 나타나지 않아 정상세포에 대한 독성반응은 나타나지 않았다(Table 2). CIA는 류마티드 관절염의 동물 실험 모델로 개발되어 류마티드 관절염의 면역학적 기전 연구와 치료 약물의 약리 효과를 검사하는

데 이용되는 방법중의 하나이다^{28,29}. 발병 기간이 비교적 짧으며 류마티드 관절염에서와 마찬가지로 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 염증 관련 cytokines 들은 CIA 진행에 결정적 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다^{28,30}. CIA와 관련된 면역학적 연구로 Kageyama 등³¹은 IFN- γ R가 결여된 DBA/1 생쥐의 CIA에서 Th1/Th2 세포의 불균형이라기 보다는 CII 특이적 IgG Ab 수치 저하를 통하여 CIA가 악화된다고 하였고, Butler 등³²은 CIA DBA/1 생쥐 모델에서 anti-IL-12 와 anti-TNF의 복합 처리에 의하여 CII에 특징적인 입과절 세포인 IFN- γ 의 생성과 증식이 감소되고, in vitro 에서 관절염 생쥐의 synovial 세포와 골수의 macrophage에 항원이 처리되었을 때, anti-TNF에 의하여 IL-12 생성이 감소되었으나, anti-IL-12는 TNF 생성에 관하여 효과가 없었음을 보고하면서, CIA에 있어서 anti-TNF 와 anti-IL-12의 상보적인 작용은 R.A. 치료에 새로운 치료법을 제공할 수 있을 것이라고 언급하였다. 본 실험에서는 먼저 DBA/1J 생쥐를 사용하여 CIA 모델의 발병률을 측정하였는데, 疏風活血湯加味方 투여군은 MTX 투여군에 비하여 유의성있는 결과는 나타나지 않았으나, 대조군에 비하여서는 억제 효과가 나타나(Table 3), Hind Paw 浮腫腫, 關節炎 指標(arthritis index)의 유의성있는 감소를 나타낸 결과(Table 4, 5)와 부합되었다. 지연형 과민반응에서도 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었고(Table 6), CD3 ϵ + /CD4+ (Table 8, Fig. 1), CD3 ϵ + /CD8+ 및 CD19+ 발현 역시 대조군에 비하여 감소함으로써(Table 9,10, Fig. 2,3), 본 시료의 면역조절 효과가 인정되었다. 관절염에 관여하는 대표적인 염증 유발 cytokine으로는 크게 활막 조직의 염증에 관련된 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 등이 있으며, 활액의 염증에 관련되는 것으로 IL-1, IL-8, TNF- α , INF- γ 등이 있고, IL-1, TNF- α , TNF- β , IGF 등은 활막의 증식에 관여하는 것으로 밝혀진 바가 있다^{33,34}. Sasai 등³⁵은 DBA/1J 생쥐의 8세대의 역교배에 의하여 만들어진 IL-6 결핍성 생쥐의 CIA에서 골조송종과 골침식, 체액성 및 세포성 응답 등이 감소됨을 보고 하면서, IL-6의 억제가 RA의 치료에 유의성이 있음을 주장하였다. 이렇듯 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 염증 관련 cytokines 들은 CIA 진행에 결정적 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있어³³⁻³⁵, 본 실험에서는 IL-6와 TNF- α 의 생성량을 ELISA kit를 사용하여 정량화하였는데, 모두 對照群에 비하여 유의성있는 감소를 나타냈다(Table 11, 12). 이 같은 결과는 상기한 지연형 과민반응, CD3 ϵ + /CD4+, CD3 ϵ + /CD8+ 및 CD19+ 발현 억제 등의 결과와 종합하여 볼 때, 본 시료의 면역 조절작용을 통한 항염증 효과가 인정된다. CIA는 조직학적으로는 증식성 염증성 관절염의 특징이 나타나 滑膜肥大와 副滑膜 조직에 염증 세포의 침착 및 세포의 관절 영역으로의 유출, 경계 영역의 파괴, 골막염, 연골 표면의 斷片化가 일어나는 것으로 보고된 바가 있는데³⁴, 본 실험에서는 대조군에서 invasion pannus, 관절내의 삼출물, 경계면의 파괴, 파사된 연골 그리고 관절연골내에 비교적 감소된 proteoglycan 등으로 경계면이 불분명하게 보여(Fig. 4) 기존의 보고와 일치되었다. 대조군의 이러한 변화와는 달리 SPHHT 투여군은 새로운 bone과 synovium이 형성되어, 정상구조와 유사한 변화를 보임으로써(Fig. 4), 본 시료가 상기한 다양

한 치료 기전을 통해, 조직의 변성을 억제한 것으로 여겨진다. 이상의 결과로 보아 疏風活血湯加味方의 면역 조절작용이 인정되어, 관절염 등을 비롯한 自家免疫疾患에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

疏風活血湯加味方의 면역 조절작용을 통한 抗關節炎 작용을 실험적으로 규명하고자, collagen에 의해 관절염이 유발된 생쥐의 면역학적, 조직학적 변화에 미치는 영향 등을 관찰한 결과, 정상세포 mLFC에 대한 세포독성 평가에서는 독성을 나타내지 않았다. CIA DBA/1J 생쥐의 arthritis index는 대조군에 비하여 유의성있게 억제되었고, 관절염 발병률은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았으며, 생쥐의 hind paw edema는 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다. 또, 지연형 과민반응은 대조군에 비하여 유의성있게 억제되었고, 비장 무게 변화는 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다. CD3 ϵ + /CD4+, CD3 ϵ + /CD8+ 및 CD19+의 발현 은 대조군에 비하여 각각 6.2%, 33.9%, 9.3% 감소되었고, CIA DBA/1J 생쥐의 혈청중 IL-6, TNF- α 분비량은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다. 조직학적 검사에서는 대조군에 비하여 새로운 bone과 synovium이 형성되었고, 상대적으로 손상이 적게 나타났다.

이상의 결과로 보아 본 시료의 면역 조절작용을 통한 항관절염 효과가 인정되어, 항 후 임상에서 광범위한 활용이 기대된다.

참고문헌

1. 서울대학교의과대학 : 면역학, 서울, 서울대학교출판부, p. 100, 114, 117, 253, 255, 262, pp. 122~131, 179~180, 266~269, 1997.
2. 權宰植 外 4人 : 痺證, 서울, 鼎談, pp.207~208, 214~215, 219~222, p.270, 1993.
3. 金定濟 : 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究所, pp.459~460, 1974.
4. 朴柄昆 : 增補韓方臨床40年, 서울, 大光文化社, p.343, 1989.
5. 白洪龍 : 常見病症辨症診治概要, 雲南省, 雲南人民衛生出版社, pp. 382~385, 1984.
6. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, pp.309-317, 1980.
7. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.370~378, 1989.
8. 黃度淵 : 證脈方藥合編, 서울, 南山堂, pp.125-126, 1992.
9. 尹用甲 : 疏風活血湯이 家兔의 腎臟 기능에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1984.
10. 楊慶錫 : 疏風活血湯 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1999.
11. 남 영 : 歷節風에 응용되는 疏風活血湯의 소염, 진통, 해열 효과에 관한 연구, 경희대학교대학원, 1981.
12. 안선준 : 鍼灸刺戟 및 疏風活血湯加味方 투여가 류마티스성 관절염 환자의 혈액에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1994.
13. 전국한의과대학 본초학교수 공편 : 本草學, 서울, 영림사,

- pp.264-265, pp.601-602, 1991.
14. 대전대학교한방병원 : 한방병원처방집, 대전, 한국출판사, p.230, 1997.
 15. Papazissi, K., geromichalos, D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H. : Optimization of the sulforhodamine B(SRB) Colormetric assay, J. Immunological method. 208, pp.151~158, 1997.
 16. Arsenault, A. L., Lhotak, S., Hunter,W.L., Banquerigo, M.L., and Brahn, E. : Taxol involution of collagen-induced arthritis: ultrastructural correlation of synovitis and neovascularization. Clin Immunol.Immunopathol. 86:280~289, 1998.
 17. Yuko : Arthritis index, Bio. Pharm. Bull. 20 (11) 1147~1150, 1997.
 18. W.R. Herzog, I. Millet, N.R. Ferreri, R. Ramabhadran, J. Schreurs and P.W. Askense : An antigen-specific DTH-initiating cell clone. Functional, phenotypical, and partial molecular characterization, The journal of Immunology, Vol. 144, Issue 10, pp.3667~3676, 1990.
 19. 김호연 : 류머티스 관절염의 병인, 서울, 대한의학협회지, 35(10) : 1198, 1992.
 20. James, B., Wyngaarden : Cecil Textbook of Medicine, Philadelphia, WA Sauders company, pp. 1508~1515, 1992.
 21. 楊維傑 編著 : 黃帝內經素問譯解, 台北市, 台聯國風出版社, pp.95~96, 328~336, 1984.
 22. 張仲景 : 金匱要略方論, 臺北, 東方書店, pp.30~39, 1950.
 23. 巢元方 : 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, pp.5~8, 1982.
 24. 王 燾 : 外臺秘要方, 서울, 大星文化社, p.424, 1983.
 25. 陳無擇 : 三因方(卷3), 大連, 國風出版社, pp.2~3, 1977.
 26. 김정진 : 농도에 따른 加味疏風活血湯 水鍼이 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1990.
 27. 송언석 : 加味疏風活血湯 水鍼이 Adjuvant 관절염에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1990.
 28. Durie, F.H., Fava, R.A. and Noelle, R.J. : Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis, Clin Immunol Immunopathol : 73(1) : 11~18, 1994.
 29. Cooper, W.O., Fava, R.A., Gates, C.A., Cremer, M.A. and Townes, A.S. : Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta, Clin Exp Immunol : 89(2) : 244~250, 1992.
 30. Takai, Y., Seki, N., Senoh, H., Yokota, T., Lee, F., Hamaoka, T. and Fujiwara, H. : Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis, Arthritis Rheum : 32(5) : 594~600, 1989.
 31. Kageyama, Y., Koide, Y., Yoshida, A., Uchijima, M., Arai, T., Miyamoto, S., Ozeki, T., Hiyoshi, M., Kushida, K. and Inoue, T. : Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor, J Immunol 1 : 161(3) : 1542~1548, 1998 Aug.
 32. Butler, DM., Malfait, AM., Maini, RN., Brennan, FM. and Feldmann, M. : Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis, Eur J Immunol : 29(7) : 2205~2212, 1999 Jul.
 33. 황상익 역 : 면역의 의미론, 하늘과학문고, pp.43, 45, 69, 92, 1998.
 34. 오찬호 역 : 신면역학입문, 지구문화사, pp.63, 118, 120, 123~124, 127~128, 175~176, 185~187, 234, 258~259, 1997.
 35. Sasai, M., Saeki, Y., Ohshima, S., Nishioka, K., Mima, T., Tanaka, T., Katada, Y., Yoshizaki, K., Suemura, M. and Kishimoto, T. : Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice, Arthritis Rheum : 42(8) : 1635~1643, 1999.