

관절염 모델에서 백굴채전탕액이 척수와 척수신경절의 calcitonin gene-related peptide와 substance P 면역반응에 미치는 영향

박종주 · 육태한 · 송범용 · 이광규¹ · 유윤조² · 이창현^{3*}

우석대학교 한의과대학 침구학교실, 1: 병리학교실, 2: 생리학교실, 3: 해부학교실

The Effects of Herba Chelidonii Extracts on Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P Immunoreactive Response in Spinal Cord and Ganglia of Adjuvant-Induced Arthritis

Jong Joo Park, Tae Han Yook, Beom Yong Song, Kwang Gyu Lee¹, Yun Jo Yu², Chang Hyun Lee^{3*}

Department of Acupuncture & Moxibustion, 1: Pathology, 2: Physiology, 3: Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the anti-inflammatory and analgesic effects of Herba Chelidoniie, the extracts of Herba Chelidoniie treated in arthritic rat model. Complete Freund,s Adjuvant(CFA) were injected in the subcutaneous tissue of left foot paw of rats to induce arthritis. Herba Chelidonii extracts(HC) was administered immediately into the peritoneal cavity after CFA injection for 12 days. The immunohistochemical stainings for calcitonin gene-related peptide(CGRP) and substance P in the L4, L5 and L6 spinal dorsal horn and ganglia were done, and the paw swelling was measured with a micrometer and the blood leukocytes were counted. The results were as follows : The paw swelling of HC treated group was significantly decreased in 12th day after CFA injection compare to control group. The change of differential leukocytes counts of HC treated group increased the ratio of lymphocytes, and decreased the ratio of neutrophils compare to control group. The extent of CGRP immunoreactive nerve fiber of dorsal horn of HC treated group was weakly stained compare to control group. The number of CGRP immunoreactive neurons of L6 spinal cord of HC treated group was significantly decreased compare to control group. The extent of substance P immunoreactive nerve fiber of dorsal horn of HC treated group was weakly stained compare to control group. The number of substance P immunoreactive neurons of L4, L5 and L6 spinal cord of HC treated group was significantly decreased compare to control group. These experimental results suggest that Herba Chelidonii extracts reduce the number of CGRP and substance P immunoreactive neurons and nerve fibers of spinal dorsal horns and ganglia, and decrease paw swelling in arthritic rat model, which may be closely related to analgesic and antiinflammatory effects of Herba Chelidonii.

Key words : Herba Chelidonii extracts, Arthritis, CGRP, Substance P, Spinal Cord.

서 론

류마티스성 관절염(Rheumatoid arthritis)은 병인이 잘 알려져 있지 않은 자가면역질환으로서 점차적으로 관절의 파괴와 관절 이상, 성숙 이전 사망 등을 초래하는 특징을 갖고 있다¹⁾. 관절염 모델을 유도하는데 이용되는 Complete Freund's adjuvant (CFA)는 관절염에 의한 면역병리학적 질환을 유도하는데 이용되는데 이는 사람의 류마티스성 관절염과 유사한 병리학적 특징

을 나타낸다²⁾. CFA를 흰쥐의 꼬리와 발바닥에 주입하면 접종 후 수 시간내에 일차적인 염증 증후와 통각과민(hyperalgesia)이 나타난다. 이러한 방법에 의하여 유도된 관절염 모델은 만성관절염의 새로운 치료제 개발시 항염증과 통통억제 효과를 분석하는데 많이 이용된다³⁾. 염증과 관련된 통증에 대한 연구는 관절염 모델을 많이 이용하는데 과거에는 염증 반응시 염증세포나 주위조직 세포에서 만들어진 화학물질들이 유해 자극 수용기를 활성화시켜 통각을 유발한다고 생각되었으나 최근에는 이러한 만성통증이 신경계내부의 변형을 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 보고되고 있다³⁾. 동물에서 통증을 측정하는 방법은 유해 자극을 회피하려는 행동을 계량화하는 방법과 전기생리학적으로

* 교신저자 : 이창현, 전북 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학
E-mail : chlee@woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1559
· 접수: 2002/01/30 · 수정: 2002/03/09 · 채택: 2002/03/25

신경전도속도를 측정하는 방법이 많이 사용되고 있다. 따라서 통증을 전달하는 신경로, 특히 1차 구심신경원인 척수신경절 신경원과 척수 뒤뿌에서 통증전달에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 calcitonin gene-related peptide (CGRP)의 척수 뒤뿌내 농도를 면역조직화학적으로 염색하여 그 변화를 관찰하는 방법이 통증의 정도와 진통효과를 검정하는 방법으로 흔히 사용하고 있다⁴⁾. 이에 저자는 消食解毒, 消腫鎮痛 등의 작용이 있는⁵⁾ 백굴채전탕액을 CFA로 유발시킨 만성관절염 모델에 복강 주사 한 후 부종, 백혈구검사 및 척수와 척수신경절내 신경원에서 통증과 관련된 펩티드 변화를 관찰하여 통증억제와 항염증 치료효과에서 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 130-150g의 숫컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 이용하였으며, 각군은 다음과 같이 4군으로 나누어서 실험을 실시하였다. 각 군은 (1) 관절염을 일으키지 않고 vehicle을 주입한 정상군(normal group), (2) 관절염을 유발한 후 생리적 식염수를 주입한 대조군(control group), (3) 관절염을 유발한 후 dexamethasone을 주사한 dexamethasone 처리군(dexamethasone treated group) (4) 관절염을 유발한 후 백굴채전탕액을 투여한 백굴채 처리군(Herba Chelidonii extracts treated group)으로 나누어 각 군에 5마리씩 배정하였다.

2. Collagen으로 유도한 관절염 모델과 발바닥 부종 측정

실험적 관절염 모델은 Malfait 등⁶⁾의 방법에 따라 Chicken sternal cartilage에서 얻은 collagen type II(Sigma, USA) 2mg을 CFA(Complement Freund's Adjuvant, Difco, Detroit, MI)에 유화시켜 흰쥐의 발바닥에 피하 주사하였다. 주사 후 1일째부터 발바닥 부종(paw swelling)은 버니어캘리퍼스를 이용하여 관절염이 유발된 쪽의 뒷다리 발바닥의 두께를 2번씩 측정하여 평균값을 이용하였으며, 실험동물은 관절염이 유발된 흰쥐만을 대상으로 12일 이상 관찰하였다. 정상군에는 백굴채 처리군과 유사하게 무균시킨 vehicle을 동량 주입한 후 같은 방법에 의하여 측정하여 비교하였다.

3. 백굴채 전탕액의 제조 및 투여

백굴채처리군에 투여하는 백굴채 전탕액은 백굴채 200g을 3L 플라스크에 증류수 1500ml와 함께 넣은 다음 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 후 3,000rpm(CF3000, Vision Co.)으로 30분간 원심분리한 다음 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축하여 200ml가 되게하여 검액으로 사용하였다. 백굴채처리군은 흰쥐 체중 100g당 1.0ml를 12일간 복강에 주사하였으며, dexamethasone 처리군은 흰쥐 체중 100g당 dexamethasone 0.1mg을 증류수 1.0ml에 희석하여 12일간 복강 주사하였다. 정상군과 대조군에는 동량의 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

4. 혈액채취 및 염색

혈액의 채취는 12일째에 모든 군의 흰쥐를 마취시킨 상태에서 헤파린을 도포한 주사기를 이용하여 심장의 좌심실에서 2ml씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 즉시 슬라이드에 smear한 후 통상적인 방법에 의하여 wright's stain을 한 후 differential leukocytes count를 시행하여 백혈구 수의 변화를 관찰하였다.

5. 표본제작

실험동물을 마취시킨 후 심장을 통하여 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1 M sodium phosphate buffer(PB)에 heparin(1000 IU/1000 ml)을 섞은 용액을 10분간 관류시키고 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 30분간 관류시켰다. 관류고정이 끝난 후 척수(L4-6) 및 척수신경절(L4-6)을 적출한 다음 동일 고정액에 4 °C에서 4시간 동안 담가 후고정을 시행하였다. 그 후 다시 0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 동안 담가 보관하였다. 보관된 척수와 신경절들은 동결절편기(Leica, JungCM3000, Germany)를 이용하여 약 30 μ m 두께의 횡단연속절편을 만들어 역시 6-well plate에 순서대로 보관한 후 자유 부유 방법(free floating method)으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

6. 면역조직화학 염색

박절된 척수와 신경절은 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 substance P 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색을 위해 박절한 조직을 0.1M phosphate buffer(PB)로 세척한 후 조직 절편내에 내재되어있을 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% 과산화수소로 처리하고 1% normal goat serum과 0.3% triton X-100으로 1시간 처리하여 비특이성 항원의 반응을 제거하였다. CGRP 염색은 1: 4000으로 희석한 일차항체(rabbit anti-CGRP)에, substance P 염색은 1:3000으로 희석한 1차항체(rabbit anti-substance P)에 조직절편들을 담가 실온에서 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차항체의 희석은 0.1M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc.)를 1:200으로 희석하여 실온에서 2시간 가량 반응시켰다. 다시 15분간 2회의 0.1 M PB 수세과정을 거친후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시키고, 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30mg의 3-3'-diaminobenzidine을 150ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러차례 수세하고 1% 오스뮴산(OsO₄) 용액으로 신경세포체와 신경섬유의 염색성을 증가시킨 후에 젤라틴이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4°C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 관찰

척수내 염색된 CGRP와 substance P의 염색성을 관찰하기 위하여 천층의 등쪽뿌를 3부위(외측부분, 중간부분, 내측부분)로 나누어 관찰하였다. 또한 척수신경절내 표지된 신경원을 계수하여 각 군별로 평균값을 통계 분석하였다.

결 과

1. 흰쥐 발바닥부종의 변화(Fig. 1)

흰쥐의 좌측 발바닥에 CFA를 주입한 후 1일째부터 12일째까지 12일간 좌측 발바닥 두께의 변화를 관찰하고 측정하였다. 관절염을 일으키지 않은 정상군의 발바닥 두께는 실험기간 동안 큰 변화는 없었다. 관절염을 유발시킨 대조군에서는 1일째부터 12일째까지 계속 증가하는 경향을 보였다. Dexamethasone 처리군에서는 발바닥 부종의 두께가 1일째부터 증가하다가 2-3일째 감소한 후 4-5일째 다시 증가하였다. 그 후 6일째부터는 다시 감소하기 시작하여 12일째는 정상군의 발바닥 두께와 유사하게 감소하였다. 백굴채처리군의 발바닥 두께는 관절염 유발 후 1일째의 정상군의 발바닥 두께인 3.97 ± 0.22mm보다 약 1.7mm 증가한 후 기간이 경과하면서 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 실험 9일째의 백굴채 처리군의 발바닥 부종의 두께는 7.8 ± 0.75mm로 대조군의 발바닥 부종의 두께인 6.84 ± 0.16mm보다 약 0.96mm가 감소하였다. 그 후 실험 12일째의 대조군에서는 7.92 ± 0.22mm이었으나 백굴채 처리군에서는 6.76 ± 0.23mm로 약 1.16mm가 유의성있게 감소하였다.

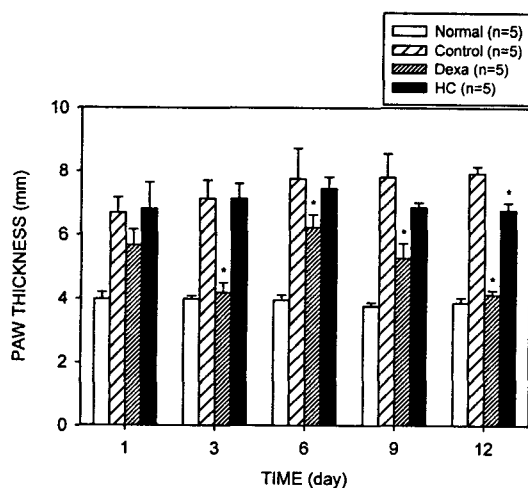


Fig. 1. The effects of Herba Chelidonii extracts(HC) on the change of paw swelling in adjuvant-induced arthritis. The change of paw thickness of HC treated group was decreased from 4 day to 10day after CFA injection compared to control group. a) Normal: normal group (vehicle(s.c.) & 1.0ml saline treatment(i.p.)). b) Control: control group (CFA(s.c.) & 1.0ml saline treatment(i.p.)). c) Dexa: dexamethasone treated group (CFA(s.c.) & 0.1mg/100g B.W treatment(i.p.)). d) HC: Herba Chelidonii extracts(HC) treated group(CFA(s.c.) & 1.0 ml HC treatment(i.p.)). The values are mean ± SD. *, p<0.05, control group vs dexamethasone treated group or HC treated group

2. 혈액내 백혈구 백분율의 변화(Fig. 2)

관절염이 유발되지 않은 정상군과 관절염이 유발된 대조군, dexamethasone 처리군, 백굴채 처리군에서 시간 경과에 따른 혈액내 백혈구 백분율을 측정하였다. 정상군은 림프구 82.0 ± 2.3%, 호중구 9.6 ± 1.6%, 단핵구 5.7 ± 0.9%, 호산구는 2.7 ± 1.1%이었으나 대조군에서는 림프구 61.8 ± 6.1%, 호중구 34.4 ± 6.6%, 단핵구 3.2 ± 1.3%, 호산구는 0.6 ± 0.5%로서 림프구의 비율은 감소하였으나 상대적으로 호중구의 비율은 증가하는 경향을 나타내었다. Dexamethasone 처리군에서는 림프구 27.3 ± 3.7%, 호중구 61.7 ± 3.2%, 단핵구 9.8 ± 2.0%, 호산구는 1.2 ± 0.6%로 림프구의 현저한 감소가 일어나 상대적으로 호중구의 비율이 증가하였다. 백굴채 처리군에서는 림프구 70.4 ± 1.6%, 호중구 27.1 ± 1.6%, 단핵구 2.1 ± 1.1%, 호산구는 0.4 ± 0.1%로서 대조군에 비하여 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구 비율은 감소하는 경향을 나타내었다.

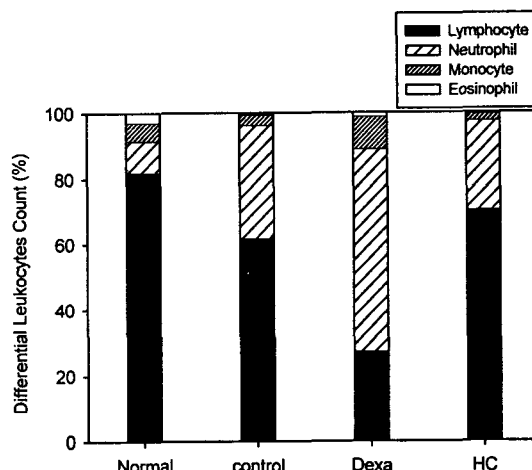


Fig. 2. The effects of Herba Chelidonii extracts(HC) on the change of differential leukocytes count in adjuvant-induced arthritis. The change of differential leukocytes counts of HC treated group was increased the ratio of lymphocytes, and decreased the ratio of neutrophils compared to control group. The legends are the same as Fig. 1.

3. 척수 뒤뿌의 CGRP 면역반응 섬유의 변화(Fig. 3)

12일째에 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿌 천층의 변화를 관찰하기 위하여 뒤뿌를 외측부분과 중간부분, 내측부분으로 나누었다. 정상군의 L4, L5, L6 척수 뒤뿌 천층의 CGRP 면역반응 신경섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 대조군과 dexamethasone 처리군, 백굴채 처리군에서는 관절염이 유발된 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군, dexamethasone 처리군, 백굴채 처리군을 비교하면 대조군이 백굴채 처리군보다 염색성이 강하였으며, 백굴채 처리군은 dexamethasone 처리군보다 염색성이 강하였다. 척수 뒤뿌 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다.

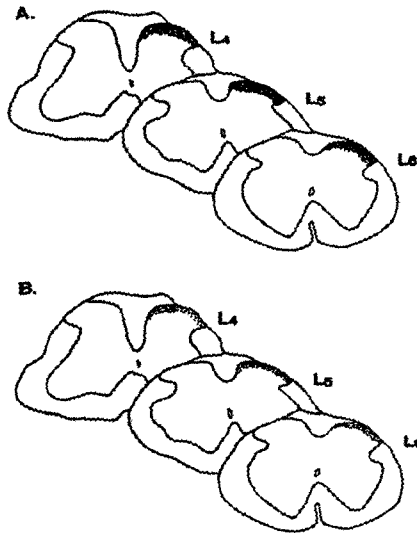


Fig. 3. Density of CGRP immunoreactive nerve fibers of control group(A) and Herba Chelidonii extracts treated group(B) in L4, L5 and L6 spinal dorsal horn in adjuvant-induced arthritis. Herba Chelidonii extracts(HC) decrease the density of CGRP immunoreactive nerve fibers.

4. 척수 신경절내 CGRP 면역반응 신경원의 변화(Fig. 4)

12일째에 L4, L5, L6의 척수신경절 신경원의 CGRP 면역반응 세포를 계수하여 관찰한 바 정상군의 L4 척수신경절의 CGRP 면역반응세포는 93.6 ± 6.3 개이었으나 대조군에서는 163 ± 21.9 개로 관절염 유발 후 CGRP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였다. 백굴채 처리군에서는 136.2 ± 15.3 개로 대조군에 비하여 감소하였으나 dexamethasone 처리군의 79.4 ± 9.7 개보다는 증가하였다. L5 척수신경절에서는 정상군에서는 91.8 ± 6.4 개이었으나 대조군에서는 120.4 ± 11.9 로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 백굴채 처리군에서는 104.8 ± 7.8 개로 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 dexamethasone 처리군의 93.0 ± 7.1 개보다는 증가하였다. L6 척수신경절에서는 정상군에서는 86.6 ± 5.8 개 이었으나 대조군에서는 122.5 ± 10.1 개로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 백굴채 처리군에서는 110.4 ± 8.7 개로 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였으나 dexamethasone 처리군의 106.8 ± 18.8 개 보다는 증가하였다.

5. 척수 뒤뿌의 SP 면역반응 섬유들의 변화(Fig. 5)

12일째에 L4, L5, L6 척수 뒤뿌 친층의 변화를 관찰하기 위하여 뒤뿌를 외측부분, 중간부분, 내측부분으로 나누었다. 정상군의 L4, L5, L6 척수 뒤뿌 친층의 CGRP 면역반응 신경섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 대조군과 백굴채 처리군에서는 관절염을 유발한 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군과 백굴채 처리군을 비교하면 대조군이 백굴채 처리군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다. Dexamethasone 처리군은 백굴채처리군보다는 미약하게 관찰되었다.

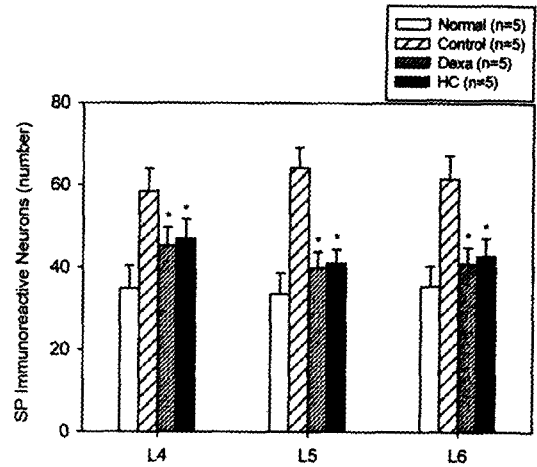


Fig. 4. Herba Chelidonii extracts(HC) decrease the number of CGRP immunoreactive neurons in L4, L5 and L6 spinal sensory ganglia in adjuvant-induced arthritis. *, significantly different from control group(p<0.05). The legend are the sama as Fig.1.

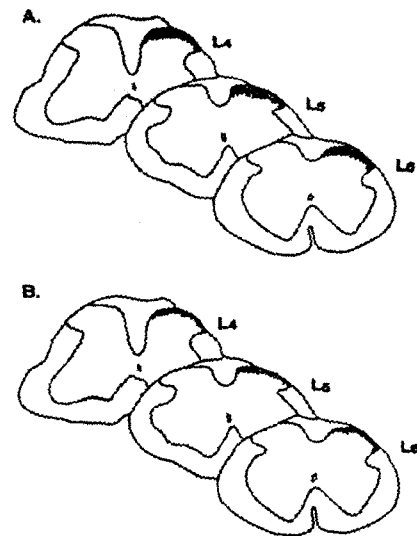


Fig. 5. Density of substance P immunoreactive nerve fibers of control group(A) and Herba Chelidonii extracts treated group(B) in L4, L5 and L6 spinal dorsal horn in adjuvant-induced arthritis. Herba Chelidonii extracts(HC) decrease the density of CGRP immunoreactive nerve fibers.

6. 척수 신경절내 SP 면역반응 신경원의 변화(Fig. 6)

12일째에 L4, L5, L6의 척수신경절 신경원의 SP 면역반응 세포를 관찰하여 계수하였다. L4 척수신경절에서 정상군의 SP 면역반응세포는 34.8 ± 5.6 개이었으나 대조군에서는 58.4 ± 5.5 개로 관절염 유발 후 SP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였다. Dexamethasone 처리군에서는 45.2 ± 4.4 개로 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 백굴채 처리군에서는 46.8 ± 4.8 개로 대조군에 비하여 감소하였으나 dexamethasone 처리군에 비

하여는 증가하였다. L5 척수신경절에서 정상군은 33.4 ± 5.2 개 이었으나 대조군에서는 64.0 ± 5.0 개로서 SP 면역반응 세포의 수는 증가하였으며, dexamethasone 처리군에서는 39.8 ± 3.9 개로 대조군에 비하여 감소하였다. 그러나 백굴채 처리군에서는 41.0 ± 3.3 개로 dexamethasone 처리군과 유사하였으나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. L6 척수신경절에서는 정상군은 35.4 ± 4.9 개이었으나 대조군에서는 61.6 ± 5.5 개로서 SP 면역반응 세포의 수는 증가하였으며, dexamethasone 처리군에서는 41.0 ± 3.8 개로 대조군에 비하여 감소하였다. 그러나 백굴채 처리군에서는 42.8 ± 4.2 개로 dexamethasone 처리군과 유사하였으나 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

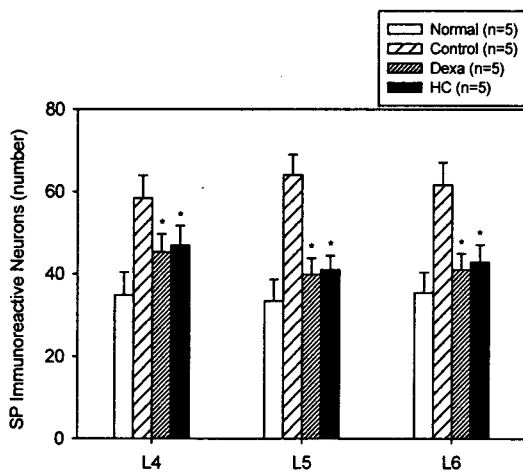


Fig. 6. Herba Chelidonii extracts(HC) decrease the number of substance P immunoreactive neurons in L4, L5 and L6 spinal sensory ganglia in adjuvant-induced arthritis. *, significantly different from control group(p<0.05). The legend are the same as Fig.1.

고찰

류마티스 관절염은 자가면역성을 강하게 시사하는 전신성 질환으로 부종과 동통을 초래하고 특징적인 관절 변형 및 강직이 유발된다. 류마티스성 관절염의 주된 발병 징후는 type II collagen, collagenase, prostagladins E2(PGE 2), stromelysin, plasminogen acticator 등의 관절강내 구성물질의 변화를 들 수 있다⁷⁾. 한의학적으로 痺症, 歷節風, 痛風, 白虎歷節風, 鶴膝風에 해당되는 이러한 병증의 원인에 대해 風寒濕의 三氣가 합하여 痺症을 일으키며, 風濕, 痰飲, 血虛로 인하거나 三陰虧損, 氣血運行濁滯등이 있다고 하였다. 또한 關節疼痛, 運動障礙, 硬直, 腫脹, 發熱 및 發赤이 나타나는 증상으로 關節炎과 유사하다고 하였다⁸⁾. 본 연구에서 사용된 Adjuvant 관절염은 유동파라핀에 표면활성제를 섞은 후 결핵사균을 첨가한 adjuvant 시약을 주입하여 유발된 만성 다발성 관절염으로 Mycobacterium butyricum을 기름에 용해하여 흰쥐의 꼬리 저부의 피하에 주입하면 3-4주간 지속되는 다발성 관절염이 야기된다⁹⁾. 이는 체액성 면역반응에도 관여하여 체중감소, 백혈구 증가등이 나타나 인체의 류마티스성 관절염과 그 임상경과가 매우 유사하게 된다⁷⁾. CFA를 흰쥐의 꼬

리와 발바닥에 주입하면 접종 후 수 시간내에 일차적인 염증 증후와 통각예민(hyperalgesia)이 나타나며, 접종 후 10-15일 제에 2차 염증반응이 나타난다. CFA의 주입에 의한 통각예민은 주입 후 8주 동안 지속되므로¹⁰⁾ 이러한 방법에 의하여 유도된 관절염 모델은 만성관절염의 새로운 치료제 개발시 항염증, 동통 억제효과를 분석하는데 많이 이용된다²⁾. 류마티스성 관절염에 많이 이용되는 치료제는 steroid hormone에 non-steroidal 항염증약을 첨가하여 치료하고 있으나¹¹⁾ 이 약은 일시적으로 염증을 억제하고 증상을 개선할 수 있으나 만성관절염의 치료에는 효과가 없는 것으로 알려졌다¹¹⁾. 白屈菜는 罂粟科(양귀비과 Papaveraceae) 식물인 白屈菜(Chelidonium majus Linne : 애기똥풀)의 大花한 전초를 건조한 것이다. 白屈菜의 性味는 苦辛, 微溫或涼, 有毒하며, 肝經, 脾經, 胃經, 肺經 및 腎經에 歸經한다. 鎮痛, 止咳, 平喘, 利尿, 清熱解毒, 消痰, 消腫 등의 作用이 있어 內服으로는 胃炎, 胃潰瘍, 腸炎, 痢疾, 肝炎, 黃疸, 肝硬化 腹水, 慢性氣管炎, 百日咳, 胃癌, 直腸癌, 食道癌 등에, 外用으로는 疥癬, 腫脹, 蛇蟲咬傷, 偶刺, 濕疹, 各種 皮膚炎 등에 응용된다. 따라서 鎮痛, 清熱解毒, 消炎, 消腫 등의 作用이 있는 白屈菜가 關節炎治療에도 응용할 수 있을 것으로 보고되기도 하였다¹²⁾. 白屈菜에 대한 실험 연구로서는 가토 소장의 평활근에 대한 작용, 중추신경억제작용, 항암작용, 항균작용, 심혈관계에 대한 작용, 위궤양치료 효과 등의 보고가 있었다¹³⁻¹⁵⁾. 본 실험에서 흰쥐의 좌측 발바닥에 CFA를 주입한 후 10일간 좌측 발바닥의 두께의 변화를 관찰한 바 백굴채 처리군의 발바닥 부종의 두께는 관절염 유발 후 1일째의 정상군의 발바닥 두께인 3.97 ± 0.22 mm보다 약 1.7mm 증가한 후 기간이 경과하면서 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 실험 9일째의 백굴채 처리군의 발바닥 부종의 두께는 7.8 ± 0.75 mm로 대조군의 발바닥 부종의 두께인 6.84 ± 0.16 mm보다 약 0.96mm가 감소하였다. 그 후 실험 12일째의 대조군에서는 7.92 ± 0.22 mm이었으나 백굴채 처리군에서는 6.76 ± 0.23 mm로 약 1.16mm가 감소하였다. 관절염 유발 후 12일간 정상군과 대조군, dexamethasone 처리군, 백굴채 처리군의 혈액내 백혈구 백분율을 관찰한 바 정상군은 림프구 $82.0 \pm 2.3\%$, 호중구 $9.6 \pm 1.6\%$, 단핵구 $5.7 \pm 0.9\%$, 호산구는 $2.7 \pm 1.1\%$ 이었으나 대조군에서는 림프구 $61.8 \pm 6.1\%$, 호중구 $34.4 \pm 6.6\%$, 단핵구 $3.2 \pm 1.3\%$, 호산구는 $0.6 \pm 0.5\%$ 로서 림프구의 비율은 감소하였으나 상대적으로 호중구의 비율은 증가하는 경향을 나타내었다. Dexamethasone 처리군에서는 림프구 $27.3 \pm 3.7\%$, 호중구 $61.7 \pm 3.2\%$, 단핵구 $9.8 \pm 2.0\%$, 호산구는 $1.2 \pm 0.6\%$ 로 림프구의 현저한 감소가 일어나 상대적으로 호중구의 비율이 증가하였다. 백굴채 처리군에서는 림프구 $70.4 \pm 1.6\%$, 호중구 $27.1 \pm 1.6\%$, 단핵구 $2.1 \pm 1.1\%$, 호산구는 $0.4 \pm 0.1\%$ 로서 대조군에 비하여 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구 비율은 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 감염증, 외상, 동맥주위염 등과 같은 급성염증시 백혈구의 수가 증가한다는 보고와 유사하게 대조군에서는 증가하였으나 백굴채 처리군에서는 호중구의 수가 현저히 감소하여 항염증 치료 효과가 있음을 알 수 있었다. 통증전달에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 calcitonin

gene-related peptide(CGRP)의 척수 뒤뿌내 농도를 면역조직화학적으로 염색하여 그 변화를 관찰하는 방법이 통증의 정도와 진통효과를 검정하는 방법으로 흔히 사용하고 있다⁴⁾. 통증전달에 관련된 신경전달물질로는 11개의 아미노산으로 구성된 peptide인 substance P가 가장 유력한 물질로 보고되어있다¹⁶⁾. 척수내에서 통각을 조절하는 것으로 추측되는 구조인 아교질(substantia gelatinosa)에는 substance P를 함유한 신경종말이 많이 분포되어 있으며¹⁷⁾, 생리학적으로도 substance P가 통각전달에 관여한다는 여러 가지 증거가 보고되었다¹⁸⁾. Calcitonin gene-related peptide는 calcitonin과 같은 유전자부위에서 나오는 일종의 신경펩타이드로 통각 전달에 상승작용을 일으키며¹⁹⁾, 이를 함유한 신경종말이 여러 말초신경에 분포하며, 통각을 전달한다고 알려진 무수초신경섬유인 C섬유와 얇은 유수초신경섬유인 A δ 섬유에서만 발견된다²⁰⁾. 또한 CGRP는 통각에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 같이 척수신경절의 신경원에서 발견되며²¹⁾, 척수 뒤뿌의 1차구심성 섬유에만 있는 것으로 보고된 펩타이드이다. 흰쥐의 등에 Complete Freund's Adjuvant를 피부 아래에 주입하면 다발성관절염이 유발되어 척수와 척수신경절 내에 CGRP가 약 50%가 증가한다²²⁾. Kaolin과 carrageenan을 흰쥐 슬관절에 주입하여 실험적으로 관절염을 유발하면 천층의 척수 중간부분(middle portion)에 CGRP의 농도가 증가한다고 보고하였다²³⁾. 실험적으로 야기한 관절염 모델에서 윤활막의 혈관주위에서 신경성장인자(nerve growth factor)의 증가가 초래된다고 하였고 윤활막에서 정제된 신경성장인자를 주입하면 염증을 일으키지 않는다고 하였다. 또한 말초의 교감신경계를 파괴하면 관절염 유발시 염증과 신경성장인자의 농도를 감소시킨다고 하였다²⁴⁾. 본 실험에서는 정상군의 L4, L5, L6 척수 뒤뿌 천층의 CGRP 면역반응 신경섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 대조군과 백골채 처리군에서는 관절염을 유발한 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군과 백골채처리군을 비교하면 대조군이 백골채 처리군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다. 12일째에 L4, L5, L6의 척수신경절 신경원의 CGRP 면역반응 세포를 관찰하여 계수하였다. 정상군의 L4 척수신경절의 CGRP 면역반응세포는 93.6 \pm 6.3개이었으나 대조군에서는 163 \pm 21.9개로 관절염 유발 후 CGRP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였다. Dexamethasone 처리군에서는 79.4 \pm 9.7개이었으나 백골채 처리군에서는 136.2 \pm 15.3개로 대조군에 비하여 감소하였으나 dexamethasone 처리군보다는 증가하였다. L5 척수신경절에서는 정상군에서는 91.8 \pm 6.4개이었으나 대조군에서는 120.4 \pm 11.9로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 백골채 처리군에서는 104.8 \pm 7.8개로 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 dexamethasone 처리군의 93.0 \pm 7.1개보다는 증가하였다. L6 척수신경절에서는 정상군에서는 86.6 \pm 5.8개이었으나 대조군에서는 122.5 \pm 10.1개로서 CGRP 면역반응 세포의 수는 증가하였다. 그러나 백골채 처리군에서는 110.4 \pm 8.7개로 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 dexamethasone 처리군의 106.8 \pm 18.8개 보다는 증가하였다.

12일째에 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿌 천층의 변화를 관찰하기 위하여 뒤뿌를 외측부분, 중간부분 및 내측부분으로 나누었다. 정상군의 L4, L5 및 L6 척수 뒤뿌 천층의 CGRP 면역반응 신경섬유는 초승달 모양으로 좌우 비슷한 염색성을 나타내었으나, 대조군과 백골채 처리군에서는 관절염을 유발한 좌측이 우측보다 강한 염색성을 나타내었다. 대조군과 백골채 처리군을 비교하면 대조군이 백골채 처리군보다 염색성이 강하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 강한 염색성을 나타내었다. 12일째에 L4, L5 및 L6의 척수신경절 신경원의 SP 면역반응 세포를 계수하여 관찰한 바 정상군의 L4 척수신경절의 SP 면역반응세포는 34.8 \pm 5.6개이었으나 대조군에서는 58.4 \pm 5.5개로 관절염 유발 후 SP 면역반응세포가 숫적으로 증가하였으며, dexamethasone 처리군에서는 45.2 \pm 4.4개로 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 백골채 처리군에서는 46.8 \pm 4.8개로 대조군에 비하여 감소하였으나 dexamethasone 처리군에 비하여는 증가하였다. L5 척수신경절에서는 정상군에서는 33.4 \pm 5.2개이었으나 대조군에서는 64.0 \pm 5.0개로서 SP 면역반응 세포의 수는 증가하였으며, dexamethasone 처리군에서는 39.8 \pm 3.9개로 대조군에 비하여 감소하였다. 그러나 백골채 처리군에서는 41.0 \pm 3.3개로 dexamethasone 처리군과 유사하였으나 대조군에 비하여 감소하였다. L6 척수신경절에서는 정상군에서는 35.4 \pm 4.9개이었으나 대조군에서는 61.6 \pm 5.5개로서 SP 면역반응 세포의 수는 증가하였으며, dexamethasone 처리군에서는 41.0 \pm 3.8개로 대조군에 비하여 감소하였다. 그러나 백골채 처리군에서는 42.8 \pm 4.2개로 dexamethasone 처리군과 유사하였으나 대조군에 비하여 감소하였다. 이상의 실험결과로 백골채 전탕액은 CFA 관절염 모델에서 부종감소, 항염증 및 통증억제 효과가 있을 것으로 사료된다.

결 론

흰쥐의 좌측 발바닥에 Complete Freund's Adjuvant를 주입하여 실험적으로 관절염을 야기시켜 백골채전탕액을 투여한 후 발바닥 부종, 항염증 및 통증억제 효과를 관찰하기 위하여 좌측 발바닥의 두께, 혈액의 백혈구백분율, CGRP, substance P 신경원과 신경섬유를 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 흰쥐 발바닥 부종의 변화는 실험 12일째의 백골채 처리군에서 대조군보다 유의성 있게 1.16mm가 감소하였다. 혈액내 백혈구백분율의 변화는 백골채 처리군이 대조군보다 림프구의 비율은 증가하였으나 호중구의 비율은 감소하였다. 척수 뒤뿌의 CGRP 면역반응 섬유의 변화는 백골채 처리군이 대조군보다 염색성이 약하였으며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 약한 염색성을 나타내었다. 척수 신경절내 CGRP 면역반응 신경원의 변화는 L4, L5, L6의 척수신경절에서 CGRP에 면역반응된 신경원의 수는 백골채 처리군이 대조군보다 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었으나, L6 신경절에서는 대조군보다 유의성있게 감소하였다. 척수 뒤뿌의 substance P 면역반응 섬유의 변화는 백골채 처리군이 대조군보다 염색성이 약하였으

며, 내외측의 염색성을 비교하면 내외측보다 중간층에서 더욱 약한 염색성을 나타내었다. 척수 신경절내 substance P 면역반응 신경원의 변화는 L4, L5, L6의 척수신경절에서 substance P 면역반응된 신경원의 수는 백골채 처리군이 대조군보다 유의성 있게 감소하였다. 이상의 실험결과로 백골채전탕액이 실험적 흰쥐 관절염 모델에서 척수와 척수신경절의 CGRP와 substance P 면역반응 세포의 수와 신경섬유의 염색성을 감소시켰으며, 또한 발바닥 부종의 두께를 감소시킴으로써 항염증과 통증억제 기능이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 우석대학교 화술연구비 지원에 의하여 수행되었음

참고문헌

- Campbell, S.M. : Rheumatoid arthritis: current strategies. *Hosp. Med.* 34, 29-32, 1988.
- Colpaert, F.C. : Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain* 28, 201-222, 1987.
- Wells, W.E. : A review of the chronic pain syndromes : etiology, transmission and treatment. *Crna* 4, 187-198, 1993.
- Zhang, R.X., Mi, Z.P., Qiao, J.T. : Changes of spinal substance P, calcitonin gene-peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin induced pain. *Regul. Pept.* 51, 25-32, 1994.
- 신민교 : 원색임상본초학, 2판, 영림출판사, 서울 p.427, 1989
- Malfait, A.M., Malik, A.S., Marinova-Mutafchieva L., Butler, D.M., Mainie, R.N., Feldmann, M. : The β 2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J. immunol.* 162, 6278-6283, 1999.
- 조윤형, 김경남, 송영상, 박영호 : 관절염에 대하여 보고된 한의학 논문에 관한 고찰. *한방재활의학과학회지* 11, 173-191, 2001.
- 육태한, 채우석 : 정공등수침이 백서의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. *대한침구학회지* 15, 75-88, 1995.
- Calvine, B., Villanueva, L., Le Bars, D. : Dorsal horn(convergent) neurons in the intact anesthetized arthritic rat. 1. Segmental excitatory influences. *Pain* 28, 81-98, 1987.
- Philippe, L., Gegout-Pottie, P., Guingamp, C., Bordji, K., Terlain, B., Netter, P., Gillet, P. : Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am. J. Physiol.* 273, R1550-R1556, 1997.
- Scott, DL., Shipley, M., Dawson, A., Edwards, S., Symmons, D.P., Woolf, A.D. : The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br. J. Rheumatol.* 37, 546-554, 1998.
- 윤인한, 박창국 : 백골채에 관한 문헌적 고찰. *동서의학* 19: 43-51, 1994.
- 한종현, 신민교, 박호식 : 백골채의 약리작용에 관한 연구. *대한한의학회지* 6:128-133, 1985.
- 소진백, 김호철, 안덕균 : 백골채의 항암 효과에 관한 연구. *대한본초학회지* 12:63-72, 1997.
- 김용득, 권기록, 이준무 : 백골채수침(白屈菜水鍼), 전탕액 투여 및 침자가 Indomethacin으로 유발된 백서의 위궤양에 미치는 영향, *대한침구학회지*, 12:177-192, 1995.
- Pernow, B. : Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35, 86-141, 1983.
- Jessel, T.M., Tsungo, A., Kanazawa, I., Otsuka, M. : Substance P depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res.* 168, 247-295, 1979.
- Henry, J.L. : Effects of substance P on functionary identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* 114, 439-451, 1976.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Renecke, M., Tschopp, F.A., Fischer, J.A. : Immunoreactive calcitonin gene-peptide and substance P coexist in sensory neuron to spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neuroscience Lett* 52, 199-204, 1984.
- McNeil, D.L., Coggeshal, R.E., Carlton, S.M. : A light and electron microscopic study of calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of the rat. *Exp. Neurol.* 99, 699-708, 1988.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. : Calcitonin gene-related peptide coexist with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptide* 6, 747-754, 1985.
- Collin, E., Mantelet, S., Frechilla, D., Pohl, M., Bourgoin, S., Hamon, M., Cesselin, F. : Increased in vivo release of calcitonin gene related peptide-like material from the spinal cord in arthritic rats. *Pain* 54, 203-211, 1993.
- Sluka, K.A., Westlund, K.N. : Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 55, 367-377, 1993.
- Aloe, L., Tuveri, M.A., Levi-Montalcini, R. : Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation. *Rheumatol. Int.* 12, 213-216, 1992.