영남의대학술지 제19권 제1호
Yeungnam Univ. J. of Med.
Vol.19 No.1. 39-48. June 2002.

□ 원저 □

흰쥐에서 다족쇄 n-3 다불포화지방산이 콜라젠-유도 관절염의 발생에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 정형외과학교실, 생리학교실*
신경호 · 김세동 · 전환진 · 장응찬* · 이석강*

The Effect of Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Development of Collagen-induced Arthritis in Rats

Kyung Ho Shin, Se Dong Kim, Hwan Jin Jeon, Eung Chan Jang*, Suck Kang Lee*

*Departments of Orthopedic Surgery and Physiology**
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

-Abstract-

Background: The treatment of rheumatoid arthritis still depend on conserve therapy in major. Recent studies report that n-3 polyunsaturated fatty acids(PUFA) could modulate the incidence and progress of arthritis. The purpose of this study was to investigate the effects of n-3 PUFA on the development of collagen-induced arthritis in rats.

Materials and Methods: Female Louvain rats were used for this experiment. Rats were randomly assigned into either normal(n=8) or collagen-immunized groups, and collagen immunized groups were divided into control(n=8, normal diet) and n-3 PUFA(n=8, 5% n-3 PUFA in diet) groups. One week after feeding n-3 PUFA to rats, they were immunized with type II collagen emulsified in incomplete Freund's adjuvant into tail and back. Development of arthritis was confirmed by x-ray and microscopic examination.

Results: Incidence of arthritis at the 5th week after immunization was 38% in control and 0% in n-3 PUFA. Rats with arthritis showed edema in hind paws and inflammation in synovial membrane of the knee joint. Plasma glucose and insulin were not changed by both of immunization and diet. Plasma triglycerides and cholesterol concentrations were decreased by n-3 PUFA.

책임저자 : 김세동, 대구시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 정형외과학교실 TEL.(053) 620-3642 FAX.(053) 628-4020

Conclusion: n-3 PUFA may prevent or treat collagen-induced arthritis in rats. Further studies are needed for action mechanism of it.

Key Words: Arthritis, n-3 polyunsaturated fatty acids, Rats

서 론

류마토이드 관절염(rheumatoid arthritis)은 자가면역에 의한 전신성 만성 염증 질환으로서 관절의 활액막(synovial membrane)을 침범하여 병의 진행에 따라 관절의 부종과 변형을 일으킨다. 일단 발병하면 보존적 치료에 주로 의존하며, 치료로 인한 항염증 작용제의 장기간 투여에 의한 부작용 또한 큰 문제로 지적되어 왔다.

최근의 연구들(Bonta 등, 1977; Hurd 등, 1981; Erickson, 1986)에 의하면 식이에 의한 조직의 지방산 구성성분 변화에 의하여 염증과 면역반응이 조절될 수 있다고 한다. Bonta 등(1977)은 쥐에서 필수지방산 결핍식이가 관절염의 발생을 억제한다고 보고하였으며, Hurd 등(1981)도 (NZB × NZW)F1 마우스에서 필수지방산 결핍식이가 자가면역 사구체신염을 방지한다고 하였다. 이의 기전으로서 필수지방산 결핍에 의한 항염증작용은 arachidonic acid의 결핍에 의해 감소된 prostaglandin의 감소에 의한다고 알려져 있으나(Dinko, 1976; Bonta 등, 1977) 조직의 지방산 구성의 변화가 항혈전이나 항염증에 미치는 기전에 대해서는 아직 자세히 알려진 바 없다. 한편 어유의 지방산은 동물이나 식물과는 다른 독특한 다족쇄 n-3 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)을 가지며 이의 주성분은 eicosapentanoic acid(EPA)와 docosahexanoic acid(DHA)로서 중성구의 세포기능을 조절할 수 있다고 한다(Spering, 1991). 또한 n-3 다불포화지방산은 염증을 매개하는 platelet activating factor 합성경로, cyclooxygenase 경로 및 5-lipoxygenase 경로를 억제한다고 한다(Spering, 1991). 그러므로 n-3 다불포화지방산의 투여시 prostaglandin과 thromboxane의 생성을 억제하여 항염증 및 항혈전작용을 가진다(Dyerberg 등, 1978). Kremer(1991)는 어유에 의한 생물학적인 변화는 leukotriene B4, platelet activating factor 및 interleukin 1의 감소에 기인한다고 하였다.

n-3 다불포화지방산이 류마토이드 관절염에 미치는 영향에 대한 연구로서는 역학적으로 n-3 다불포화지방산을 많이 포함하는 어유를 많이 섭취하는 사람에서 염증성 관절질환의 발생율이 낮다는 보고가 있다(Kromann과 Green, 1950; Bang 등, 1971). 실험모델 동물에서의 연구에서는 n-3 다불포화지방산의 섭취시 부종 등의 염증증상이 완화된다고 하였으며(Karmali 등, 1981; Prickett 등, 1981; Zurier, 1982; Robinson 등, 1986), 류마토이드 관절염 환자에서는 n-3 다불포화지방산이 염증증상과 비-스테로이드성 항염증 작용제의 용량을 경감시켜 줄 수 있다고 하였다(Kremer 등, 1985; Kremer 등, 1987; Geusens 등, 1994; Lau 등, 1994). Robinson 등(1994)은 n-3 다불포화지방산이 전신성 홍반 낭창증(systemic lupus erythematosus) 모델 마우스에서 자가면역질환

을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 Prickett 등(1984)은 콜라젠(collagen)을 투여한 흰쥐에서 n-3 다불포화지방산이 풍부한 어유의 투여가 관절염 증상의 정도에는 영향을 주지 않았으나 발생은 더 증가시켰다고 보고 하였으며, Lippiello 등(1990)은 흰쥐에서 고농도의 어유 투여시 전자현미경 소견에서 관절염의 악화를 보고한 바 있다.

이와같이 어유로부터 정제된 n-3 다불포화지방산의 투여가 흰쥐에서 콜라젠에 의한 관절염의 발생을 증폭시키는지 아니면 감소시키는지를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

실험동물은 콜라젠의 투여에 의한 면역유도(Trentham, 1982)에 의하여 관절염이 잘 발생하는 것으로 알려진 Louvain종(Peacock 등, 1992)(LOU/Mward, Jackson Laboratory, MA, USA) 흰쥐 암컷(체중 100-110 gm)을 사용하였다. 실험군은 정상군과 면역유도군으로 나누었으며, 면역유도군은 다시 대조군 및 n-3 다불포화지방산 투여군으로 구분하였다. 관절염 유도 1 주일 전부터 동물 사육에 사용된 식이의 조성은 표 1과 같다. 어유는 농축된 ARJ사(OR, USA)의 Omega Ⅲ(EPA: 18%, DHA: 12%)를 사용하였다.

관절염은 제 2형 콜라젠(acid soluble collagen type Ⅱ from bovine nasal septum, Sigma, USA) 600 ㎍을 0.1M acetic acid에 녹인 후 incomplete Freund's adjuvant(Sigma, USA)에 유화시켜 꼬리와 등의 피하조직에 주입하여 면역유도(immunization)하였다(Trentham, 1982). 관절염은 면역유도 제 5주에 족부의 부종(paw edema)과 골변화 등을 육안 및 x-ray 사진으로 확인하고, 슬관절의 활액막 부위를 광학현미경으로 관찰하였다. 면역유도 제 5 주에 실험동물을 pentothal sodium(40 ㎎/㎏)으로 마취한 후 족관절의 x-ray 사진을 찍은 다음 복부대동맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 실혈사시킨 다음 슬관절을 분리하여 10% 포르말린 용액으로 고정시킨 다음 Hematoxylin-Eosin으로 염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 관절조직의 상태를 조사하였다. 면역유도와 n-3 PUFA 투여가 체내 대사에 미치는 영향을 간접적으로 평가하기 위하여 채취된 혈액을 4℃

Table 1. Composition of experimental diets

Composition	Normal(%)	n-3 rich diet(%)
Starch	60	60
Casein	18	18
Cellulose	5	5
Vitamin mixture	1	1
Mineral mixture	4	4
Butter	7	7
Corn oil	5	-
Fish oil	-	5

Table 2. Body weight changes at the 5th week of post-immunization in rats

Group	Body weight(gm)		Gain in body weight (gm)
	Initial	After 6 wks	
Normal (n=5)	104 ± 3.1	204 ± 3.3	100
Control (n=5)	105 ± 2.8	150 ± 6.0*	45
n-3 PUFA† (n=5)	102 ± 2.1	154 ± 5.3*	52

Values are mean ± SD
* $p<0.01$ vs normal
†n-3 PUFA : Polyunsaturated Fatty Acids

에서 즉시 원심분리하여 혈장을 분리한 다음 -75℃에 냉동보관하였다가 인슐린, 중성지방 및 총 콜레스테롤 양을 측정하였다.

혈당은 glucose oxidase를 이용한 Sidekick 1500 혈당측정기(Yellow Spring Instrument, USA)로 측정하였다. 혈장 인슐린은 insulin-specific antibody가 흡착된 시험관(Coat-A Count, DPC, USA)을 이용한 방사면역법으로 측정하였다. 혈장 유리지방산은 acyl-synthetase와 acyl-coA oxidase를 이용한 일본 Nissui회사제의 키트(V-NEFA)로 정량하였다. 혈장 총 콜레스테롤은 cholesterol esterase와 cholesterol oxidase를 이용한 아산제약의 키트(콜레스테롤 효소제)로 정량하였다. 혈장 중성지방은 lipoprotein lipase, glycerol kinase, peroxidase, L-α-glycerooxidase를 이용한 아산제약의 키트(Cleantech TG-S)로 정량하였다.

실험성적은 평균과 표준오차로 나타내었으며, 통계학적 분석은 SPSS/PC+를 이용하여 일원분산분석을 하였다.

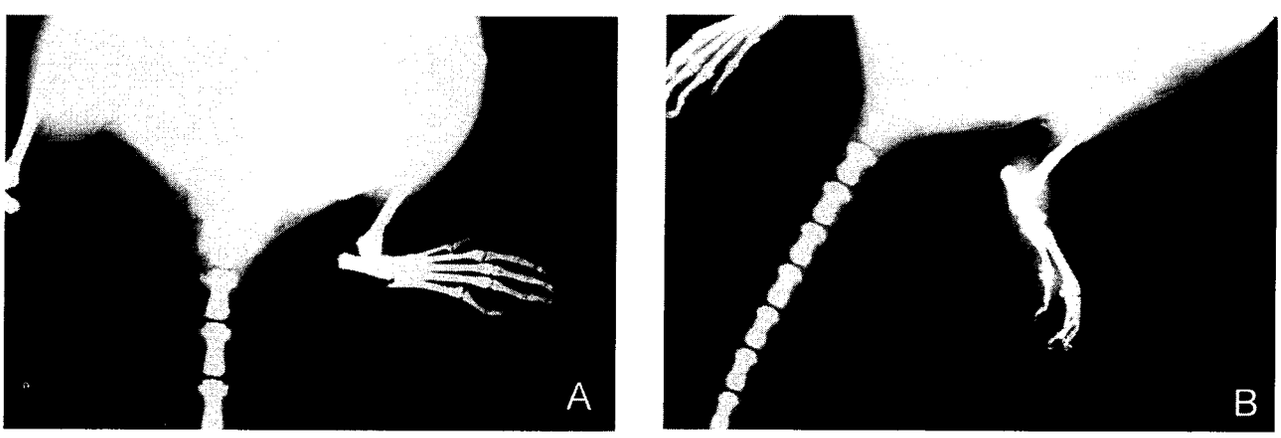

Fig. 1. Effect of n-3 PUFA on x-ray finding of ankle joint at the 5th week of post-immuunization in rats.
A: normal, 5 of the 8 control, and n-3 PUFA rats without paw edema.
B: 3 of the 8 control rats with severe paw edema.

결 과

각 군 간의 체중 변화는 정상군의 체중증가(gm)가 100인데 비하여 대조군과 n-3 다불포화지방산군은 각각 45와 52로서 면역유도에 의하여 현저히 감소하였다(표2, $p<0.01$).

면역유도에서 제 5주에서 육안 및 x-ray 상에서 족부종은 대조군에서 38%의 발생률을 보인 반면에 n-3 다불포화지방산군에서는 발생하지 않았다(표 3, 그림 1).

슬관절의 활액막을 광학현미경(×400)으로 관찰한 결과 Hematoxylin-Eosin 염색상에서 족부의 부종이 있는 쥐에서는 염증반응이 관찰되었으며, 부종이 없는 쥐에서는 염증반응이 없었다(그림 2).

Table 3. Effect of n-3 PUFA on incidence of paw edema at the 5th week of post-immunization in rats

Group	Incidence	
	n	%
Normal (n=8)	0	0
Control (n=8)	3	38
n-3 PUFA* (n=8)	0	0

* n-3 PUFA : Polyunsaturated Fatty Acids

n-3 다불포화지방산이 혈당(㎎/㎏)에 미치는 영향은 정상군이 94±3.7인데 비하여 대조군은 98±3.1, n-3 다불포화지방산군은 95±3.8로 각

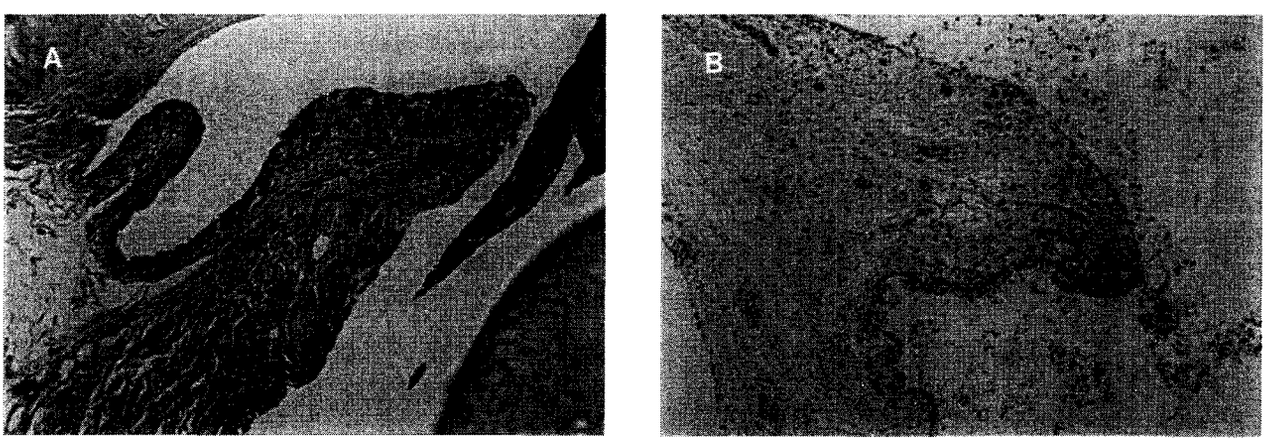

Fig. 2. Effect of n-3 PUFA on microscopic finding(×400) of knee joint at the 5th week of post-immunization in rats(Hematoxylin-Eosin stain).
A: normal, 5 of the 8 control, and n-3 PUFA rats without inflammatory cells in synovial membrane.
B: 3 of the 8 control rats with inflammatory cells in synovial membrane.

Table 4. Effects of n-3 PUFA on levels of blood glucose and plasma insulin at the 5th week of post-immunization in rats

Group	Glucose (mg/dl)	Insulin (μU/ml)
Normal (n=8)	94 ± 3.7	24 ± 2.1
Immunization		
Control (n=8)	98 ± 3.1	22 ± 3.8
n-3 PUFA* (n=8)	95 ± 3.8	21 ± 4.2

Values are mean ± SD
* n-3 PUFA : Polyunsaturated Fatty Acids

군간의 유의한 차이는 없었다. 혈장 인슐린(μU/mℓ)은 정상군의 24±2.1 에 비하여 대조군과 n-3 다불포화지방산군은 각각 22±3.8, 21±4.2로 유의한 차이가 없었다(표 4).

n-3 다불포화지방산이 지질대사에 미치는 영향으로서, 유리지방산은 각 군간의 차이가 없었으나 중성지방(mg/dl)은 정상군과 대조군이 각각 47±3.1, 48±4.2 인데 비하여 n-3 다불포화지방산군은 32±2.6 으로 n-3 PUFA에 의하여 감소하였으며, 콜레스테롤 또한 같은 경향이었다(표 5).

Table 5. Effects of n-3 PUFA on plasma free fatty acids, triglyceride and total -cholesterol concentrations at the 5th week of post-immunization in rats

Group	Free fatty acid (μEq/l)	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)
Normal (n=8)	452 ± 55	47 ± 3.1	40 ±3.9
Immunization			
Control (n=8)	524 ± 49	48 ± 4.2	41 ± 3.5
n-3 PUFA* (n=8)	487 ± 59	32 ± 2.6†	35 ± 2.4‡

Values are mean ± SD
* n-3 PUFA : Polyunsaturated Fatty Acids
†$p<0.01$ vs normal and control
‡$p<0.05$ vs normal and control

고 찰

류마토이드 관절염의 치료는 보존요법에 주로 의존하며, 장기간의 투약에 의한 부작용이 큰 문제로 지적되어 왔다. 최근에 이의 치료법으로 어유로부터 분리된 다족쇄 n-3 다불포화지방산이 류마토이드 관절염의 증상의 완화 및 부작용 감소에 대한 연구와 더불어 임상에서 시범적으로 사용중에 있다(Kremer 등, 1985; Kremer 등, 1987; Geusens 등, 1994; Lau 등, 1994). 이에 앞서 n-3 다불포화지방산을 많이 포함하는 어유를 많이 섭취하는 사람에서 염증성 관절질환의 발생률이 낮다고 하는 역학적 연구가 있다(Kromann과 Green, 1950; Bang 등, 1971). 이의 기전으로 어유가 cyclooxygenase 와 5-lipooxygenase등의 상경적 억제를 통하여 항염증작용을 나타낸다(Robinson 등, 1986)고 하며, 일부 면역 억제 작용의 가능성도 배제할 수 없다고 한다(Cleland 등, 1988). 이에 대한 연구로서 1994년에 Geusens 등(1994)은 n-3 다불포화지방산이 활동성 류마토이드 관절염 환자의 치료에 유용한 효과가 있다고 하였으며, Lau 등(1994) 역시 n-3 다불포화지방산이 비-스테로이드성 항염증 작용제의 사용을 줄일 수 있다고 보고하였다. 그러나 면역반응으로 유도한 류마토이드 관절염 유도 흰쥐에서 n-3 다불포화지방산은 관절염의 발생을 더 증가시킬 수 있다는 보고(Lippiello 등, 1990)도 있다.

본 연구에서는 콜라젠과 incomplete adjuvant의 투여시 대조군의 38%에서만이 족부종이 관찰되었으며 n-3 다불포화지방산의 투여군에서는 발생하지 않았다. 슬관절의 광학현미경학적 소견으로서 족관절의 부종이 생긴 쥐에서는 염증반응을 보였으며, 부종과 골의 변형이 생기지 않은 쥐에서는 염증반응이 없었다. 이는 Lippiello 등(1990)의 보고와는 다르나, 다불포화지방산이 lymphocyte transformation을 억제하고 동종피부이식의 생존을 증가시켰다는 Mertin 등(1974)과 Ring 등(1974)의 보고에 비추어 볼때 n-3 다불포화지방산이 면역을 억제시킨 결과로도 생각되나 본 연구에서는 관절염의 발생 정도가 대조군에서 38% 정도에 그친 점 등을 고려해 보아 이에 대한 더 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

n-3 다불포화지방산이나 콜라젠 투여에 의한 혈당과 혈장 인슐린의 변화는 없었다. 그러나 혈장 지단백에 있어서는 유리지방산은 변화가 없었으나 중성지방과 총콜레스테롤은 유의하게 감소하여 다른 연구자의 보고(Harris 등, 1983; Fasching과 Ratheiser, 1991)에 비추어 볼 때 이것이 n-3 다불포화지방산의 지질감소 효과에 의한 것임을 알 수 있었다.

이상의 결과로 미루어 보아 n-3 다불포화지방산의 투여가 관절막의 염증반응이나 족부의 부종을 경감시켜 줄 수 있을 것으로 기대되며 이의 기전이 관절염 발생의 억제에 있는 것인지 아니면 발생후의 항염증작용에 기인하는지는 비면역반응에 의한 관절염 모델과의 비교연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

n-3 불포화지방산이 관절염의 발생 및 경과에 미치는 영향에 대해 알아보고자 Louvain종 흰쥐를 사용하여, 실험군을 정상군과 면역유도(콜라젠 + incomplete Freund's adjuvant) 군으로 나누었고, 면역유도군은 다시 대조군 (정상

식이) 및 n-3 다불포화지방산군 (식이에 5% n-3 다불포화지방산 함유) 으로 구분하여, 관절염 유도 1 주일전부터 n-3 다불포화지방산이 함유된 식이를 섭취시켰으며 관절염의 발생여부를 x-ray 소견과 광학현미경적 관찰을 통하여 확인하였다.

면역유도 5 주에 대조군의 38%에서 x-ray 소견상 족부종과 광학현미경상 염증소견이 발견되었으나 n-3 다불포화군에서는 이러한 변화가 없었다. 혈당과 혈장 인슐린은 면역유도나 n-3 다불포화지방산 투여에 의한 변화가 없었으나 혈장 중성지방과 콜레스테롤은 n-3 다불포화지방산투여에 의하여 감소하였다.

n-3 다불포화지방산의 투여가 콜라젠에 의한 관절염의 발생을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 생각되며 이의 작용기전을 설명하기 위하여 후속 연구가 요망된다.

참 고 문 헌

Bang HO, Dyerberg J, Nielsen A: Plasma lipid and lipoprotein patterns in Greenlandic west coast Eskimos. Lancet 1: 1143-1145, 1971.

Bonta IL, Bult H, Vincent JE, Zijlstra FJ: Acute anti-iflammatory effects of aspirin and dexamethason in rats deprived of endogeneous prostaglandin precursors. J Pharm Pharmacol 29: 1-7, 1977.

Cleland LG, French JK, Betta WH, Murphy GA, Elliott MJ: Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 15: 1471-1475, 1988.

Dinko CW: Modification of adjuvant inflammation in rats deficient in essential fatty rats. Agents Actions 6: 636-641, 1976.

Dyerberg J, Bang HO, Stofferson E, Moncada S, Vane JR: Eicosapentanoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. Lancet 2: 117-119, 1978.

Erickson KL: Dietary fat modulation of immune response. Int J Immunopharmac 8(6): 529-543, 1986.

Fasching P, Ratheiser K: Metabolic effects of fish oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. Diabetes 40: 583-589, 1991.

Geusens P, Wouters C, Nijs J, Jiang Y, Dequeker J: Long-term effect of omega-3 fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 37 (6): 824-829, 1994.

Harris WS, Connor WE, Mcmurry MP: The comparatives reduction of the plasma lipid and lipoprotein by dietary polyunsaturated fats; Salmon oil versus vegetable oils. Metab 32: 179-184, 1983.

Hurd ER, Johnston JM, Okita JR, MacDonald PC, Ziff M, Gilliam JN: Prevention of glomerulonephritis and prolonged survival in New Zealand black/New Zealand white F1 hybrid mice fed an essential fatty acid-deficient diet. J Clinic Invest 67: 476-485, 1981.

Karmali RA, Hanrahan R, Volkman A, Smith N: Prostaglandins and essential fatty acids in regulation of autoimmunity and develo-

pment of autoantobodies to DNA in NZB x NZW F1 mice. Prog Lipid Res 20: 655-661, 1981.

Kremer JM, Bigaouette J, Michalek AV, Timchalk MA, Lininger L, Rynes RI, Huyck C, et al.: Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. Lancet 1: 184-187, 1985.

Kremer JM, Jubiz W, Michalek AV, Rynes RI, Bartholomew LE, biagouette J, Timchalk M, et al.: Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis: a double-blinded, controlled, crossover study. Ann Intern Med 106: 497-503, 1987.

Kremer JM: Clinical studies of omega-3 fatty acid supplementation in patients who have rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am 17: 391-402, 1991.

Kromann N, Green A: A epidemiological studies in the Upernavik Kistrict, Greenland. Acta Med Scand 208: 401-406, 1950.

Lau CS, Morley KD, Belch JJ: Effects of fish-oil supplementation on non-steroidal anti-inflammatory drug requirement in patients with mild rheumatoid arthritis-a double-blind placebo controlled study. Br J Rheumatol 32(11): 982-989, 1994.

Lippiello L, Fienhold M, Grandjean C: Metabolic and ultrastructural changes in articular cartilage of rats fed dietary supplements of omega-3 fatty acids. Arthritis and Rheumatism 33(7): 1029-1036, 1990.

Mertin J, Hughes D, Shenton BK, Dickinson JP: *In vitro* inhibition by unsaturated fatty acids of the PPD- and PHA-induced lymphocyte response. Klin Wochenschr 52: 248-250, 1974.

Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E: Angiogenesis inhibition supresses collagen arthritis. J Exp Med 175: 1135-1138, 1992.

Prickett JD, Robinson DR, Steinberg AD: Dietary enrichment with polyunsaturated fatty acid eiacosapentanoic acid prevents proteinura and prolongs survival in NZB x NZW F1 mice. J Clin Invest 68: 556-559, 1981.

Prickett JD, Trentham DE, Robinson DR: Dietary fish oil auguments the induction of arthritis in rats immunized with type II collagen. J Immunol 132(2): 725-729, 1984.

Ring J, Serfeit J, Mertin J, Brendel W: Prolongation of skin allografts in rats treated with linoleic acid. Lancet 2: 1331, 1974.

Robinson DR, Prickett JD, Makoul GT, Steinberg AD, Colvin RB: Dietary fish-oil reduces progression of established renal disease in (NZB x NZW) F1 mice and delays renal disease in BXSB and MRL/1 strains. Arthritis Rheum 29: 539-546, 1986.

Robisson DR, XU LL, Tateno S, Guo M, Colvin RB: Suppression of autoimmune disease by dietary n-3 fatty acids. J Lipid Res 34(8): 1435-1444, 1994.

Spering RI: Dietary omega-3 fatty acids: effects on lipid mediators of inflammation

and rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am 17(2): 373-389, 1991.

Trentham DE: Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. evidence pro and con. Arthritis Rheum 25: 911-916, 1982.

Zurier RB: Prostaglandins, immune responses, and murine lupus. Arthritis Rheum 25: 804-809, 1982.