

豨薺이 RA 병태 모델에서 關聯因子 및 組織學的 변화에 미치는 영향

조영주 · 김성훈¹ · 박종오 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀

Effects of Siegesbeckiae Herba on rheumatoid arthritis induced by collagen in MRL/MpJ-lpr-lpr Mice

Young Ju Jo, Sung Hoon Kim¹, Jong Ho Park, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University,
1:Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

For evaluating the effect of Siegesbeckiae Herba (here after abbreviated as SBH) on rheumatoid arthritis, the experiment was carried out ; Incidence of rheumatoid arthritis, IRA(indices of rheumatoid arthritis), immunophenotypes by flow cytometer and histopathological changes in MRL/MpJ-lpr-lpr Mice in vivo were studied. The results were obtained as follows : 1. Incidence of RA in MRL/lpr mice was suppressed to 60% of control by SBH. 2. IRA was significantly reduced for IgG3 and IgM at 20 weeks of age and for IgG2b at 12 and 20 weeks of age in mice by SBH compared with control. 3. Immunophenotypes such as CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ were significantly increased by SBH compared with control. 4. In histopathological analysis, SBH suppressed the progression of PMN(polymorphonuclear leukocyte), leukocyte and fibroblast infiltration, and subsynovial soft tissue edema frequently showing in the early stage of the arthritis, and also effectively reduced the degeneration of cartilages and degenerative bone symptoms. These results suggest Siegesbeckiae Herba can be effectively applied to the treatment of rheumatoid arthritis and it is still necessary to isolate effective compound from Siegesbeckiae Herba in the near future.

Key words : Siegesbeckiae Herba(豨薺), Immunophenotypes

서 론

류마토이드 關節炎은 慢性 關節炎 중 退行性 關節炎 다음으로 好發하는 關節炎으로, 전세계 인구의 1% 가량에서 發病하고, 남성보다는 여성이 3-5배 發病率이 높으며, 약 70%가 20-30대 사이의 젊은 층에서 나타난다. 그 예후에 있어서도 10-20%는 完治되지만 대부분은 慢性으로 넘어가며, 재발과 회복을 반복하면서 서서히 진행하다 결국엔 關節의 變形 및 破壞를 가져온다^{1,2)}. 류마토이드 關節炎의 原因은 免疫學的, 代謝內分泌學的, 組織學的, 生化學的 檢索이 進行되어 왔지만 아직 명확하게 糾明되어 있지 않으며, 최근에는 自己免疫 globulin에 대한 抗體가 되어 그 抗原 抗體 結合物이 組織에 침착해서 組織障壁를 일으킨다고 생각되어 류마토이드 關節炎의 發生機轉을 免疫學的 反應으로 說明하

고 있다¹⁻⁵⁾. 류마토이드 關節炎의 症狀은 주로 關節에 나타나지만, 全身의인 疾患으로 대부분은 서서히 시작되며 初期에는 衰弱感, 막연한 關節痛, 筋肉痛이 오고 몇 주에서 몇 달 후에는 關節에 侵犯된다. 특히 關節이 붓고 局所發熱과 疼痛이 있으며, 아침에 일어날 때나 움직이지 않고 있다가 움직일 때 關節強直의 症狀이 나타난다²⁾. 이에 대한 西洋醫學的 治療로는 疾患이 심하거나 合併症이 발생한 경우에 시행되는 保存療法, 變形이 심하여 일상 생활이 힘든 경우에 시행되는 手術療法 및 藥物療法 등이 있다⁶⁻⁸⁾. 특히 다용되는 藥物療法的의 경우, 비스테로이드계 消炎劑, 살리실산염, 副腎皮質 호르몬, 免疫抑制劑 등이 사용되고 있으나, 服用에 따른 胃腸管 障壁, 肝障壁 및 骨髓抑制作用 등의 부작용^{2,7,8)}이 문제시되고 있다.

韓醫學에서 류마토이드 關節炎은 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痺症 등의 範疇에 속한다고 볼 수 있으며, 이에 대한 治療法으로 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡 및

* 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2003/01/29 · 수정 : 2003/02/28 · 채택 : 2003/03/28

滋補肝腎 등이 활용⁹⁻¹⁷⁾되고 있다.

류마티스 관절염에 대한 실험적 연구로는 楊¹³⁾, 安¹⁴⁾, 梁¹⁵⁾이 각각 舒筋立安散, 消痰逐水湯 및 蒼耳子藥鍼이 류마티스 관절염의 cytokine에 미치는 영향을 보고한 바가 있으며, 이 밖에 金¹⁶⁾이 류마티스樣關節염에 應用되는 防己의 效能에 관한 실험적 연구를, 李¹⁷⁾가 檳蘇散加味方이 류마티스 관절염 환자의 fibroblast-like synoviocytes에서 免疫反應에 미치는 영향을 연구報告하였으나, 單一藥物을 주제로 하거나, 자연誘發된 실험動物을 사용한 경우는 없다. 豨薺는 菊花科에 속한 一年生 草本인 진득찰 *Siegesbeckia glabrescens* Makino과 同屬 近緣植物의 全草를 乾燥한 것으로, 祛風濕, 利筋骨, 通經絡, 清熱解毒하는 效能이 있어, 風濕痺痛, 筋骨無力, 腰膝痠軟, 四肢麻痺, 半身不遂, 風疹濕瘡, 瘡疾, 急性肝炎, 高血壓 등을 治療하며, 瘡毒, 癰腫 및 濕疹 등에는 生用하고 風濕痺證에는 黃酒蒸用한다¹⁸⁻¹⁹⁾. 이에 대한 실험적 연구로 趙²⁰⁾는 血壓와 血糖에 미치는 영향을, 權²¹⁾은 豨薺의 糖類에 관한 연구를, 鄭²²⁾은 흰쥐의 藥物性 肝障害에 미치는 영향을 報告하였으나, 祛風濕 通經絡하는 效能이 있음에도 불구하고 關節염에 관한 연구는 全無한 實情이다. 이에 著者는 上記한 本草學의 效能에 準하여 이를 試料로 in vivo에서 류마티스 關節염의 實驗的 모델인 MRL/lpr 마우스의 關節염 發生率, 류마티스 因子와 免疫細胞 發顯 및 組織學的 變化 등을 檢索하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 材料

1) 動物

本 實驗을 위하여 使用된 MRL/MpI-lpr/lpr 생쥐(H-2k)는 韓國生命工學研究院에서 分讓 (5 주령) 받아 3 주 후 實驗에 使用하였으며, 實驗當日까지 固形飼料 (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)와 물을 充足히 供給하고, 室溫 22 ± 2℃를 계속 유지하면서 3 주일간 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 藥物

本 實驗에 使用된 豨薺 (*Siegesbeckia Herba*, 이하 SBH)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

Table 1. Prescription of *Siegesbeckia Herba*

韓藥名	豨薺
學名	<i>Siegesbeckia glabrescens</i> Makino
生藥名	<i>Siegesbeckia Herba</i>

3) 試藥 및 機器

本 實驗에 使用된 試藥은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 培養

液, isopropanol, 赤血球溶血液 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma 社 (U.S.A) 製品을 使用하였으며, 牛胎兒血清 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 社 (Logan, U.S.A) 製品을, agarose (FMC, U.S.A), 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

本 實驗에 使用된 機器는 熱湯抽出器 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A) 및 光學顯微鏡 (Nikon, Japan) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料 製造

豨薺 300 g에 蒸溜水 1,300 ml을 가하여 熱湯抽出器에서 3 시간 加熱하여 얻은 抽出液을 濾過한 후 減壓蒸溜裝置로 濃縮하고, 이를 다시 凍結乾燥機를 이용하여 얻은 完全 乾燥한 粉末 (15.8 g)을 冷凍 (-84℃) 보관하면서 適當한 濃度로 稀釋하여 使用하였다.

2) 實驗群 選定 및 藥物 投與

MRL/lpr 생쥐 5 마리씩을 아무 處理를 하지 않은 對照群, 八物湯 250mg/kg을 投與한 陰性對照群 (PalMulTang, 이하 PMT), SBH 250 mg/kg을 投與한 實驗群 등 3 개 群으로 나누어 8 주령부터 20 주령까지 投與하였다.

3) 血清內 류마티스 因子 (RF) 分析²³⁾

RF인 IgG3, IgM과 IgG2b 測定은 MRL/lpr 생쥐 12 주와 20 주에 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 生産量을 測定하였다. 각 well에 MRL/lpr 생쥐 血清 100 μl (1/100 dilution)씩 分注하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 washing 완충 용액으로 2 회 洗滌한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 處理하고 1 시간 室溫에서 방치한 후 다시 洗滌하였다. TMB 기질을 100 μl씩 分注하여 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μl의 stop 溶液을 處理하고 ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 吸光度를 測定하였다.

4) 免疫 細胞 分析

20 주 후 MRL/lpr 생쥐에서 분리한 脾臟細胞에 赤血球溶血液를 處理하여 赤血球를 除去하고 4℃에서 免疫 螢光 染色을 실시하였고, 각각에 FITC-anti-CD4, PE-anti-CD25, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD8, PE-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-NK1.1을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 磷酸緩衝

生理食鹽水로 水洗하고 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4⁺/CD25⁺, CD3e⁺/CD8⁺, B220⁺/CD69⁺, CD3e⁺/N.K 1.1⁺ 細胞數를 百分率 (%)로 分析하였다.

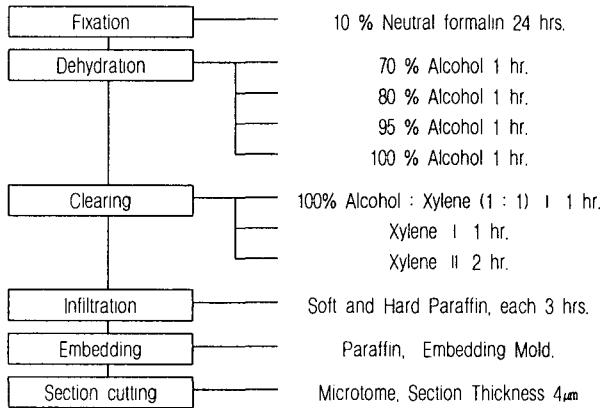


Fig. 1. Tissue processing

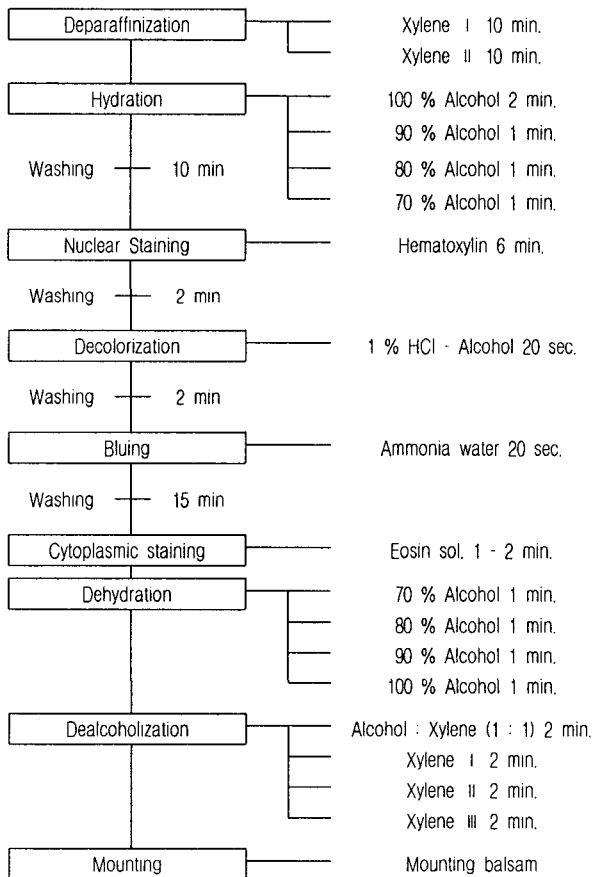


Fig. 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

5) 組織學的 檢査 (histopathology)

實驗 20 주 후에 각 實驗群에서 四肢 關節을 분리하여 生理食鹽水로 血液을 洗滌하고 적당한 크기로 切開하여 통상의 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 48 시간 동안 고정하였다. 고정된 關節들은 組織內 固定液 除去를 위해 흐르는 물에 水洗을 하고

70% 알콜 농도로부터 濃度 상승 순으로 탈수하였다. 탈수된 組織들은 xylene 溶液에 투명과정을 거친 다음 溶解된 파라핀에 침투 및 포매 과정을 거쳐 블럭을 제작하였다. 만들어진 블럭은 4 µm 두께로 박절기 (microtome)를 이용하여 절편을 만들어 slide glass에 부착하고, 일반적인 변화를 관찰하기 위해 hematoxylin 과 eosin (H & E) 染色을 실시하여 光學顯微鏡하에서 관찰 및 사진 촬영을 하였다. 組織病理學的인 분석은 네가지 등급으로 분리하였다; 없든지 또는 무시해도 좋은 정도의 변화 (no or negligible changes(-)), 가벼운 경증 (mild (+)), 약간 중증 (moderate (++)) 및 심한 중증 (severe (+++))으로 나누어 판단하였다. 그 예로 synovial lining cells의 增殖은 각각 細胞의 수가 3 개 또는 그 이하일 때 (-), 4 개에서 5 개일 때 (+), 6 개에서 8 개일 때 (++) , 그리고 9 개에서 또는 그 이상일 때 (+++)로 觀察 結果를 나타내었다. polymorphonuclear leukocyte (PMN) infiltration의 경우는 PMNs 없을 때 (-), 3 개 또는 그 이하일 때 (+), 4 개 또는 5 개 (++) , 그리고 6 개 또는 그 이상일 때 (+++)로 觀察 結果를 分析하였다.

실험성적

1. 關節炎 發生率에 미치는 影響

關節炎 發生率에 미치는 影響에서는 對照群이 2 등급 2 마리, 3 등급 3 마리로 나타나 關節炎 發生率이 100%로 나타난 반면, 陰性對照群은 1 등급 1 마리, 2 등급 2 마리, 3 등급 2 마리로 80%, SBH 投與群은 0 등급 2 마리, 1 등급 1 마리, 2 등급 2 마리로 40%의 發生率이 나타나 SBH 投與群에서 가장 낮은 發生率이 나타났다(Table 2).

Table 2. Effects of SBH on Incidence and Histopathologic Grade of Arthritis in MRL/lpr Mice

Group	Dose (mg/kg)	Arthritis grade			Arthritis incidence
		0	1	2 3	
Control (MRL/lpr)	0		2	3	5/5(100)
PMT	250		1	2	4/5(80)
SBH	250	2	1	2	2/5(40)

In MRL/lpr mice, preliminary studies revealed that arthritis progressed and reached a plateau level by 16 weeks of age. Histopathological analysis of 6, 8, 10 and 12 weeks old MRL/lpr mice disclosed that the peak severity of PMN infiltration was observed at 8 weeks and the subsynovial soft tissue edema became severer from 8 to 12 weeks of the age. Each joint was graded on a scale of 0-3, where 0 normal, 1 thickening and proliferation of the synovial lining, with slight inflammatory cell infiltration, 2 grade 1 changes plus granulosomatous lesions in the synovial sublining tissue, and 3 grade 2 changes plus pannus formation and bone destruction. The mice were orally administered of PMT and SBH (250 mg/kg) for 20 weeks after severer from 8 to 12 weeks of the age. * Values are the number of mice or the number of arthritis-positive (grade 2 and 3)/total number examined (%).

2. IgG3 류마티드 因子에 미치는 影響

류마티드 因子인 IgG3에 미치는 影響에서는 12주, 20주에서 對照群은 각각 2.9 ± 0.53, 4.6 ± 0.56 (mg/ml)으로 나타난 반면, 陰性對照群은 2.5 ± 0.76, 3.8 ± 0.86 (mg/ml), SBH 投與群은 1.8 ± 0.37, 2.7 ± 0.77 (mg/ml)로 나타나 SBH 投與群 중 20주에서 有意性있는 減少가 나타났다(Fig. 3).

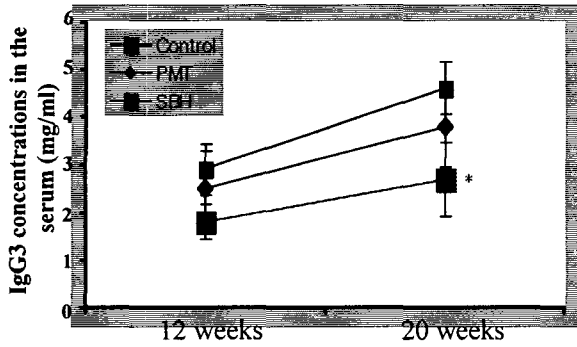


Fig. 3. Effects of SBH on immunoglobulin G3 in the serum rheumatoid factor (RF) of MRL/lpr mice. In MRL/lpr mice, preliminary studies revealed that arthritis progressed and reached a plateau level by 16 weeks of age. The mice were orally administered of PMT and SBH (250 mg/kg) for 12 weeks after severer from 8 weeks of the age. Indicated doses of agents were orally administered once a day to MRL/lpr mice from 8 weeks of age. Levels of IgG3 RF's in the serum obtained from 12 and 20 weeks old mice were determined by ELISA using 1 : 50 and 1 : 200 dilutions, respectively, and the data are expressed as the mean optical density at 490 nm \pm SEM (n = 5). Statistically significant value compared with control group by T test (* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

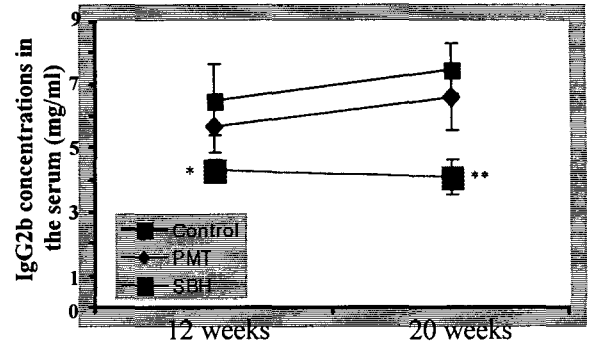


Fig. 3. Effects of SBH on immunoglobulin G2b in the serum rheumatoid factor (RF) of MRL/lpr mice.

3. IgM 류마토이드 因子에 미치는 影響

류마토이드 因子인 IgM에 미치는 影響에서는 12주, 20주에서 對照群은 각각 3.5 \pm 0.66, 3.7 \pm 0.41 (mg/ml)으로 나타났다. 그러나 陰性對照群은 3.6 \pm 0.51, 3.4 \pm 0.67 (mg/ml), SBH 投與群은 2.7 \pm 0.49, 2.5 \pm 0.42 (mg/ml)로 나타나 SBH 投與群 중 20 주에서 有意性있는 減少가 나타났다(Fig. 4).

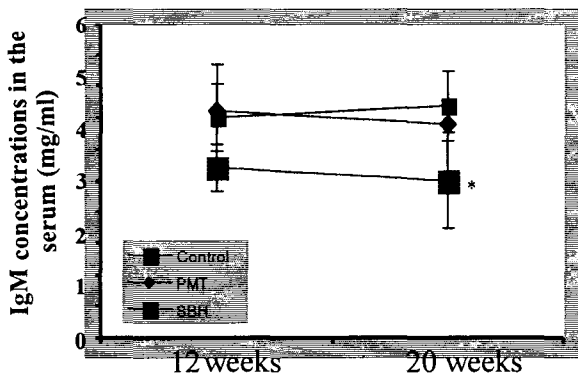


Fig. 4. Effects of SBH on immunoglobulin M in the serum rheumatoid factor (RF) of MRL/lpr mice.

4. IgG2b 류마토이드 因子에 미치는 影響

류마토이드 因子인 IgG2b에 미치는 影響에서는 12주, 20 주에서 對照群은 각각 6.5 \pm 1.12, 7.5 \pm 0.79 (mg/ml)으로 나타난 반면, 陰性對照群은 5.7 \pm 0.84, 6.6 \pm 1.04 (mg/ml), SBH 投與群은 4.3 \pm 0.35, 4.1 \pm 0.56 (mg/ml)로 나타나 SBH 投與群 중 12, 20 주 모두에서 有意性있는 減少가 나타났다(Fig. 5).

5. 免疫細胞에 미치는 影響

CD4+/CD25+에서는 對照群은 21.0 (%), 陰性對照群은 25.6 (%)로 나타난 반면, SBH 投與群은 35.9 (%)로 나타나 對照群에 비하여 增加하였다(Table 3, Fig. 6).

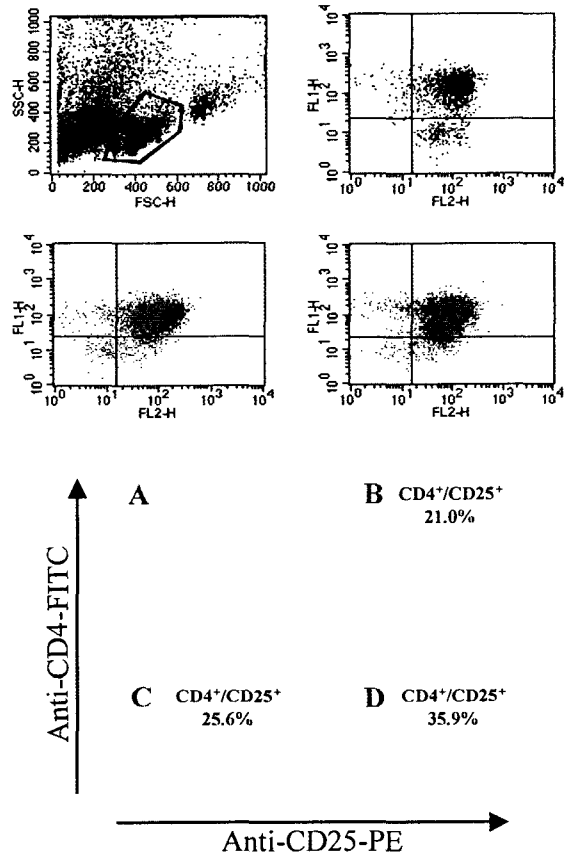


Fig. 6. Effects of SBH on the percentage of CD4+/CD25+-gated cells in MRL/lpr mice. The mice were orally administered of PMT (C) and SBH (250 mg/kg, D) for 12 weeks after severer from 8 of the age. Indicated doses of agents were orally administered once a day to MRL/lpr mice from 8 weeks of age. After 20 weeks, MRL/lpr (control, B) mouse PBMCs (5×10^6 cell/ml) were isolated, and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A).

Table 3. Effects of SBH on the Percentages of Lymphocytes and Natural Killer-gated Cells in PBMCs of MRL/lpr Mouse

Group	Dose	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ (%)	CD8 ⁺ /CD3e ⁺ (%)	CD69 ⁺ /B220 ⁺ (%)	NK ⁺ /CD3e ⁺ (%)
Control MRL/lpr	0	21.0	4.5	27.6	12.6
PMT (mg/kg)	250	25.6	7.7	25.1	14.9
SBH (mg/kg)	250	35.9	15.6	38.7	18.4

CD8⁺/CD3e⁺에서는 對照群은 4.5 (%), 陰性對照群은 7.7 (%)로 나타난 반면, SBH 投與群은 15.6 (%)로 나타나 對照群에 비하여 增加하였다(Table 3, Fig. 7). CD69⁺/B220⁺에서는 對照群은 27.6 (%), 陰性對照群은 25.1 (%)로 나타난 반면, SBH 投與群은 38.7 (%)로 나타나 對照群에 비하여 增加하였다(Table 3, Fig. 8).

NK⁺/CD3e⁺에서는 對照群은 12.6 (%), 陰性對照群은 14.9 (%)로 나타난 반면, SBH 投與群은 18.4 (%)로 나타나 對照群에 비하여 增加하였다(Table 3, Fig. 9).

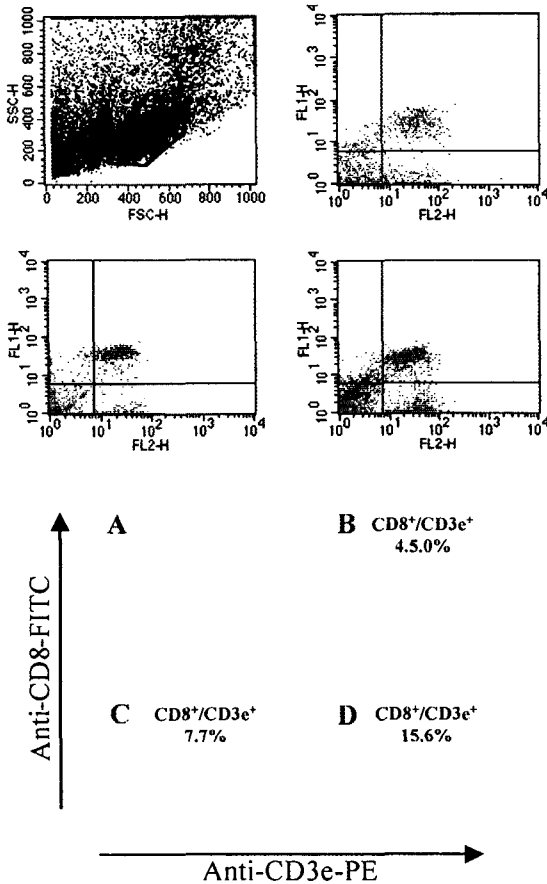


Fig. 7. Effects of SBH on the percentage of CD8⁺/CD3e⁺-gated cells in MRL/lpr mice.

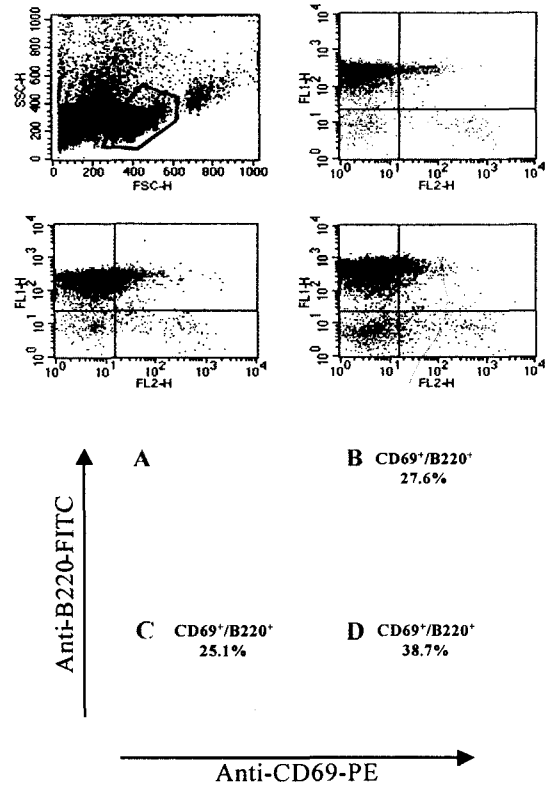


Fig. 8. Effects of SBH on the percentage of CD69⁺/B220⁺-gated cells in MRL/lpr mice.

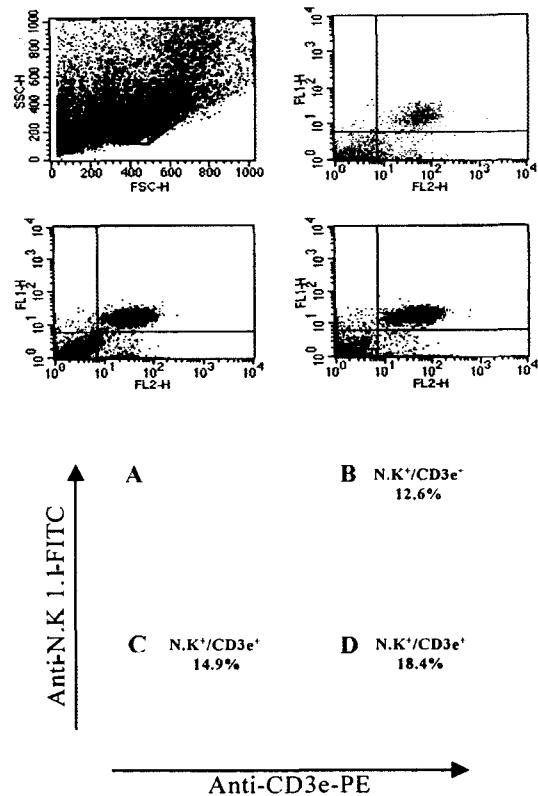


Fig. 9. Effects of SBH on the percentage of N.K1.1/CD3e⁺-gated cells in MRL/lpr mice.

Table 4. Effects of SBH on Indices of Articular Lesion in 20 Weeks Old MRL/lpr Mice

Articular lesions	Grading	Control	PMTa) (250mg/kg)	SBHa) (250mg/kg)
PMN infiltration	-	0	0	2
	+	1	3	2
	++	3	2	1
	+++	1	0	0
Lymphocyte infiltration	-	0	0	1
	+	3	4	3
	++	2	1	1
	+++	0	0	0
Fibroblast infiltration	-	0	1	2
	+	2	1	3
	++	2	3	0
	+++	1	0	0
Synovial soft tissue edema	-	1	1	3
	+	3	2	2
	++	1	2	0
	+++	0	0	0
Cartilage degeneration	-	0	1	4
	+	2	3	1
	++	3	1	0
	+++	0	0	0
Cartilage/bone replaced By granulation tissue	-	0	0	3
	+	0	1	2
	++	1	3	0
	+++	4	1	0
New bone formation	-	2	1	5
	+	3	4	0

a) Indicated doses of PMT and SBH were orally administered once a day to MRL/lpr mice from 8 weeks of age. Each group consists of 5 mice. PMT = 250 mg/kg of PMT treated group, SBH = 250 mg/kg of SBH treated group

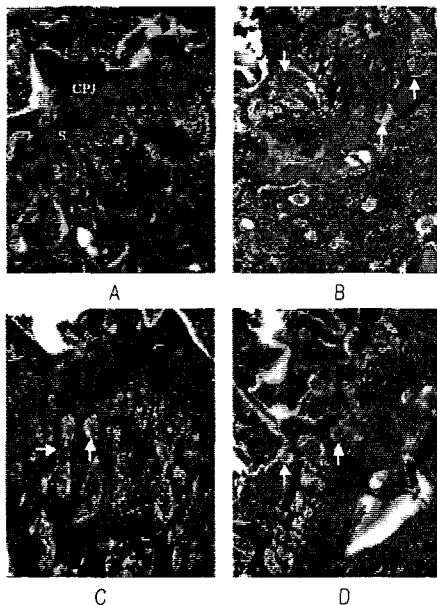


Fig. 10. Representative sections showing the grades of histopathologic manifestations of arthritis in the ankle joints of MRL/lpr mice. A, Ankle joint in a male 8-week-old mice, showing no proliferation of the synovial (S) lining cells, cartilage pannus junction (CPJ). B, Glo-merulonephritis in a male 20-week-old mouse, manifesting an endocapillary proliferative type, associated with severe inflammatory cell infiltrates, mesangial deposits of hyaline materials and crescent formation (grade 1). C, Extensive proliferation of synovial lining cells and lymphocyte infiltration changes of synovial sublining tissue, associated with severe inflammatory cell infiltration (grade 2), but without pannus formation. D, Fibroblast infiltration in the synovial sublining tissue, extending to the bone, showing pannus formation (grade 3). (H & E stain; original magnification ×40.)

6. 組織學的 變化

20 주제 MRL/lpr 마우스의 關節 障礙 指數를 分析한 結果, 關節炎 初期에 나타나는 症狀인 polymorphonuclear leukocyte (PMN) 浸潤, 淋巴球 浸潤, 纖維芽 細胞 浸潤, 滑液 軟部 組織 浮腫과 末期에 나타나는 症狀인 軟骨의 退化 그리고 뼈 關聯 症狀 등에서 對照群에 비해 SBH 投與群 모두 障礙 指數가 현저히 減少하였다(Table 4, Fig. 10, 11).

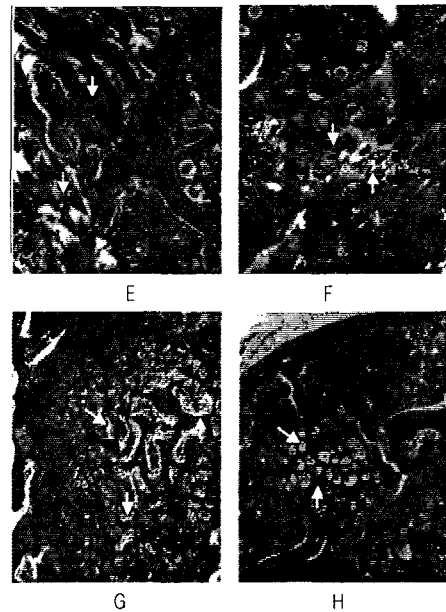


Fig. 11. Representative sections showing the grades of histopathologic manifestations of arthritis in the ankle joints of MRL/lpr mice. Articular lesions in the late stage of MRL/lpr mice arthritis were characterized by cartilage degeneration (F), new bone formation (G) and pannus formation which were severer than those in the early stage. PMN infiltration and subsynovial soft tissue edema (E) were observed as characteristic lesions in the early stage. The lesions, including the calcaneus bone (H) and anterior and posterior synovial tissue at the ankle joints, were evaluated histopathologically. SBH suppressed progression of PMN infiltration, subsynovial soft tissue edema and multiplication of synovial lining cells in the early stage of the arthritis. (H & E stain; original magnification ×40.)

고 찰

關節에서 發生하는 疾患은 他 臟器와 같이 外傷性, 感染性, 免疫性, 代謝性, 退行性 기원의 다양한 疾病이 생길 수 있으며, 그 중 疼痛, 關節腫脹, 發赤 및 發熱 등의 症狀이 나타나는 疾患을 關節炎이라 한다^{1,7,8}. 臨床적으로 關節炎은 化膿性 關節炎, 結核性 關節炎, 류마토이드 關節炎 등으로 區分되며, 류마토이드 關節炎은 慢性關節炎 중 退行性 關節炎疾患 다음으로 흔히 볼 수 있는 疾患이다^{1-5,7,8}. 류마토이드 關節炎은 남성보다 여성에게서 3-5배 많이 發病되며, 보통 手足의 小關節에 대칭성으로 症狀이 初發된다. Morning stiffness, 疼痛, 腫脹이 主症狀으로 나타나며, 무릎과 같은 大關節에서도 發病된다. 關節이나 tendon 주위에 滑液膜의 肥厚 소견이 나타나며, 滑液의 retention, 熱感, 發赤 등의 症狀이 初期에 나타나며, 전형적인 예로서는 rheumatic node 가 팔꿈치 근처의 前腕伸側에 나타난다^{1-5,7,8}. 류마토이드 關節炎

은 韓醫學의 歷節風, 鶴膝風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 痛痺, 痺痛, 痺症, 風痺, 痺證 등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있다^{9,17}. 《素問·痺論》²⁴에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕 外邪가 痺證의 重要한 原因이라고 言及했으며, 《金匱要略》²⁵에서는 “短氣 自汗出 歷節疼 不可屈伸 此皆飲酒 汗出 當風所致”, 《巢氏諸病源候論》²⁶에서 “由人體虛 腠理開 故受風邪也”, 《外臺秘要方》²⁷에서 “白虎病者 大都 是風寒暑濕之毒 因虛所致 將攝失理受 此風邪 經脈結滯 血氣不行 畜於骨節之間 或在四肢”, 《三因方》²⁸에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 形成되어 發病한다고 보았다. 또한 《東垣十種醫書》²⁹에서 “彼痛風者 因血受熱 已自沸騰 其後 或涉冷水 或立濕地 或扇取涼 或臥當風 寒涼外搏 熱血 得寒 汚濁凝滯 所以作痛”, 《醫學入門》³⁰에서 “痛風…形怯瘦者 多內因 血虛有火 形肥勇者 多外因 風濕生痰 以其循歷遍身 曰歷節風 甚如虎咬 曰白虎風”, “痛多痰火 腫多風濕然”, “鶴膝風…三陰虧損 風邪入 亦有虛火 陰血枯 所以病後 多此疾.”, 《景岳全書》³¹에서 “真陰衰弱 精血虧損 故三氣得而 勝之而爲痺.”, 《萬病回春》³²에서 “痛風者…謂之白虎歷節風 都是血氣風濕痰火 皆令作痛 或勞力寒水相搏 或酒色醉臥 當風取涼 或臥風濕之地 或雨汗濕衣 蒸體而成痛風 在上者 多屬風 在下者 多屬濕”, 《醫學心悟》³³에서 “痺者 痛也 風寒濕三氣雜之 合而爲痺也”, 《醫林改錯》³⁴에서 痺症有瘀血說을 主張하였고, 最近文獻인 《實用中醫內科學》³⁵에서는 肝腎虧損, 邪氣侵入, 氣血瘀阻 등으로 보았다.

류마토이드 關節炎에 대한 實驗的 研究로는 楊¹³, 安¹⁴, 梁¹⁵이 각각 舒筋活絡, 消痰逐水湯 및 蒼耳子藥鍼이 류마토이드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響을 報告한 바가 있으며, 이밖에 金¹⁶이 류마티스樣 關節炎에 應用되는 防己의 效能에 關한 實驗的 研究를, 李¹⁷가 檳蘇散加味方이 류마토이드 關節炎 患者의 fibroblast-like synoviocytes에서 免疫反應에 미치는 影響을 研究 報告하였다. 本 試料인 稀莢은 그 性味가 寒無毒苦하고, 肝脾腎經으로 入하여, 祛風濕, 利筋骨, 通經絡, 清熱解毒하는 效能이 있어 風濕痺痛, 筋骨無力, 腰膝痠軟, 四肢麻痺, 半身不遂, 風疹濕瘡, 瘧疾, 急性肝炎, 高血壓 등을 治療하며, 生用하면 그 性味가 辛苦氣寒하고 去濕熱하는 效能이 있어 熱痺에 有效하고, 熟用하면 그 性味가 苦寒甘溫하여 祛風濕하면서 補肝腎, 強筋骨하는 效能이 있다¹⁸⁻¹⁹. 이에 대한 研究로, 趙²⁰는 稀莢이 血壓과 血糖에 미치는 影響을, 權²¹은 稀莢의 糖類에 關한 研究를, 鄭²²은 稀莢의 水溶性 抽出物이 흰쥐의 藥物性 肝障害에 미치는 影響을 報告하였으나, 류마토이드의 自家免疫의 病理 機轉에 基礎한 免疫 調節作用에 關한 研究는 全無한 實情이다.

이에 著者는 祛風濕, 通經絡하는 效能이 있는 稀莢을 試料로, in vivo에서 류마토이드 關節炎의 實驗的 模型인 MRL/lpr 마우스의 關節炎 發生率, 류마토이드 因子 生産, 免疫細胞 發顯 및 組織學的 變化 등을 檢索하였다. 動物 實驗에 사용된 MRL/lpr 생쥐는 非正常 活性 T 細胞 (CD4+ CD7- CD28-)들이 직·간접으로 炎症 誘發 細胞들에 影響을 주어 cyclooxygenase-2(COX-2) / 5-lipoxygenase (LOX)를 過剩으로 生産하는 代謝過程을 거쳐 初期 무릎 關節에 polymorphonuclear leukocyte

(PMN) infiltration과 edema가 발생하는 自家免疫疾患 (autoimmune disorders)의 誘發 原因이 되는 動物 模型³⁶이다.

In vivo에서는 이러한 病態 模型을 이용하여 關節炎 抑制에 대한 SBH의 效果를 살펴보기 위해, 關節炎 發生率, 류마토이드 因子에 미치는 影響, CD4+/ CD25+, CD8+/CD3e+, CD69+/B220+, NK+/CD3e+의 變化 그리고 組織學的 變化 등을 살펴 보았다. 먼저 關節炎 發生率의 測定은 모두 4等級으로 나누어 관찰하였는데, 對照群이 2 等級 2 마리, 3 等級 3 마리로 나타나 關節炎 發生率이 100%로 나타난 반면, 陰性對照群은 1 等級 1 마리, 2 等級 2 마리, 3 等級 2 마리로 80%, SBH 投與群은 0 等級 2 마리, 1 等級 1 마리, 2 等級 2 마리로 40%의 發生率을 나타내어 對照群에 비하여 60%의 抑制 效果가 나타나 動物實驗에서도 關節炎 發生이 抑制되었다(Table 1).

Rheumatoid factor(RF)는 1940년에 Waaler에 의해 처음 발견되어³⁷, IgG의 Fc 부분에 결합하는 自家免疫抗體로서 免疫反應에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 이것은 여러 가지 感染疾患뿐 아니라 RA, Sjogren's syndrome (SS), mixed cryoglobulinemia (MC) 등과 같은 自家免疫疾患과도 연관되어 있음이 研究되어져 있다. 바이러스나 細菌, 寄生蟲 感染으로 인해 발생한 RF는 病原菌에 대한 二次 免疫反應의 結果物로, 낮은 親和力을 지니고, 일시적으로 증가하여 細胞 防禦機能을 하지만, RA, SS, MC와 같은 疾患에서는 自家免疫作用을 하는 것으로 알려져 있다³⁹. 특히, 약 75%의 류마토이드 關節炎 患者 血清에 존재하는 RF는 류마토이드 關節炎과 큰 연관성을 보여, American College of Rheumatology (ACR)에서 정한 7가지 류마토이드 關節炎 決定 基準 중 하나이기도 하다. 이러한 RF는 IgM, IgG 및 IgA 종류에 속하며 關節局所에 浸潤된 B 림프구와 形質細胞로부터 생산된다고 추측되고 있다^{38,39}. 이것의 機轉은 RF가 自家 IgG와 결합하여 免疫複合體를 형성하고, 이는 補體의 活性化 및 連鎖反應을 일으키며, 中性粒과 A형 滑膜細胞는 免疫複合體를 貪食하게 되고 그 결과 活性化된 콜라겐 分解酵素, 中性 펩티드 分解酵素 등의 리소좀 酵素가 遊離되어 關節의 破壞를 일으키며 프로스타글란딘 E2는 破骨細胞의 骨吸收를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 대부분의 RF's는 IgM 아형이지만, 疾患의 상태가 심할수록 RF의 종류는 IgG와 IgA를 포함한다^{39,40}.

류마토이드 關節炎에서의 RF는 다른 疾患의 경우와는 달리 류마토이드 關節炎에 특이적인 것으로 알려져 있고, 이러한 점은 부작용이 있는 抗炎症劑나 免疫抑制劑, cytotoxic agent의 단점을 보완할 수 있는 治療法 開發에 이용되는데, Ramsland 등⁴¹은 aspartame이 RF 반응성을 방해한다는 것을 밝힘으로써 RA 治療劑 개발의 가능성을 넓혔다.

本 試料의 RF에 미치는 影響은 12 주와 20 주에 각각 檢索하였는데, 모든 RF가 對照群 및 陰性對照群에 비해 減少하였으며, 특히 IgG3와 IgM은 20 주, IgG2b는 12, 20 주 모두에서 有意性있는 減少가 나타났다. 이 結果는 SBH 投與群이 陰性對照群에 비하여 월등히 減少함으로써, 他 韓藥材에 비해 류마토이드 關節炎에 效果的으로 作用할 것으로 思料된다(Fig. 1-3).

류마토이드 關節炎은 自家免疫의 原因이 되는 分子나 그 과

정은 糾明되지 않았지만 역시 유사한 과정을 통해 발생하게 된다. 먼저 非正常的으로 活性化된 免疫體系 (예, CD4+ CD7-CD28-)가 손이나 무릎의 關節 안쪽의 움직이는 부위를 공격함으로써 炎症과 痛症을 誘發하고 결국에는 關節에 회복할 수 없는 損傷을 입히게 된다^{42,44}. 非正常 活性 T 細胞 (CD4+ CD7-CD28-)들은 正常的인 活性免疫細胞 (CD8+/CD69+/CD44+)들에 의하여 apoptosis(細胞死)로 除去되어 關節炎 誘發을 抑制하게 된다. 정상적인 免疫細胞들이 活性化되기 위하여 CD4+/CD8+, B細胞(B220+), 그리고 T 細胞 계열의 NK+細胞들의 活性 免疫細胞數의 증가와 더불어 co-stimulation 因子인 CD28+이 活性化되어야 정상적인 活性免疫細胞 (CD8+/CD69+/CD44+)들이 생성된다^{42,45}. 본 실험에서 免疫細胞에 미치는 影響은 CD4+/CD25+, CD8+/CD3e+, CD69+/B220+, NK+/CD3e+에서 對照群 및 陰性對照群에 비하여 모두 增加하였다(Table 2, Fig. 1-3).

MRL/lpr 생쥐는 생후 8 주령 이후 PMN infiltration이 觀察되고, 8-12 주령 이후는 subsynovial soft tissue edema 症狀이 심하게 나타나기 시작한다. 또한 10 주 또는 16 주 이후는 대부분의 關節의 障礙가 관찰되는데, 全體의인 分析 觀點은 初期부터 關節의 障礙에 深化를 誘發하게 되는 PMN infiltration과 subsynovial soft tissue edema를 들 수 있고, 後期는 cartilage degeneration과 pannus formation 그리고 bone 關聯 症狀을 들 수 있다.

本 實驗에서는 MRL/lpr 마우스의 關節炎 初期에 나타나는 症狀인 PMN 浸潤, 淋巴球 浸潤, 纖維芽 細胞 浸潤, 滑液 軟部 組織 浮腫과 末期에 나타나는 症狀인 軟骨의 退化 그리고 뼈 關聯 症狀 등에서 對照群과 陰性對照群에 비해 SBH 投與群 모두 障礙 指數가 현저히 減少하였다(Table 3, Fig. 8, 9). 이상의 결과로 보아 SBH는 in vivo에서 關節炎 發生率, 류마티오이드 因子와 免疫細胞 發顯 및 組織學的 變化 등에서 모두 有意性 있는 抑制 및 增加가 나타나, 향후 다양한 處方과의 조합을 통해 RA에 안정된 治療劑로서 응용 가능할 것으로 思料된다.

결 론

稀莖이 류마티오이드 關節炎에 미치는 影響을 糾明하고자, 實驗 모델인 MRL/lpr 마우스의 關節炎 發生率, 류마티오이드 因子와 免疫細胞 發顯 및 組織學的 變化 등을 檢索하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

MRL/lpr 마우스를 이용한 關節炎 發生率은 對照群에 비하여 60%의 抑制率에 나타났고, 류마티오이드 因子에 미치는 影響에서는 IgG3와 IgM은 20 주에서, IgG2b는 12 주와 20 주에서 對照群에 비하여 有意性있는 減少가 나타났으며, 免疫細胞에 미치는 影響에서는 對照群에 비하여 CD4+/CD25+, CD8+/CD3e+, CD69+/B220+, NK+/CD3e+ 모두 增加하였다. 組織學的 變化에서는 關節炎 初期에 나타나는 polymorphonuclear leukocyte (PMN) 浸潤, 淋巴球 및 纖維芽 細胞 浸潤, 滑液 軟部 組織 浮腫과 末期에 나타나는 軟骨의 退化 및 關聯 症狀이 對照群에 비하여 현저히 減少하였다.

以上の 結果로 보아 稀莖이 免疫調節作用을 통한 류마티오이드 關節炎 治療에 매우 效果的으로 應用될 수 있을 것으로 보여, 향후 有效 物質 探索에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 大韓病理學會 : 病理學, 高文社, pp.1036, 1037, 2000.
2. 김상호 外 : 一般 病理學, 高文社, pp.39-41, 1997.
3. 大韓病理學會 大邱·慶北支部學會 : 간추린 病理學, 정문각, p.514, 2000.
4. 광성규 外 : 基礎 病理學, 정문각, p.391, 392, 1998.
5. 송계용 外 : 核心 病理學, 圖書出版 高麗醫學, pp.783-787, 1998.
6. 조명제 外 : 알기 쉬운 病理學, 현문사, p.382, 1996.
7. 金寅相 : 整形外科 Rehabilitation, 第一醫學社, pp.159-170, 1988.
8. 金寅相 : 關節과 骨折治療, 第一醫學社, pp.200-207, 1988.
9. 權幸植 外 : 痺證, 圖書出版 鼎談, pp.207-226, 1993.
10. 路志正 外 : 實用中衣風濕病學, 人民衛生出版社, pp.453-466, 1996.
11. 袁浩 : 中醫骨病學, 上海科學技術出版社, pp.41-49, 1998.
12. 大韓臨床病理學會 : 臨床病理學, 圖書出版 高麗醫學, pp.463, 464, 2000.
13. 楊泰勳 : 舒筋立安散이 류마티오이드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
14. 安景模 : 消炎逐水湯이 류마티오이드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
15. 梁起榮 : 蒼耳子藥鉞이 류마티오이드 關節炎의 cytokine에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
16. 김영훈 : 류마티스樣 關節炎에 應用되는 防己의 效能에 關한 實驗의 研究, 慶熙大學校 博士學位論文, 1987.
17. 李仲偉 : 檳蘇散加味方이 류마티오이드 關節炎患者의 fibroblast-like synovial cells에서 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 2002.
18. 凌一揆, 顏正華 : 中藥本草學, 保健新聞社, 서울, p.313, 314, 1998.
19. 李時珍 : 本草綱目, 中國中醫藥出版社, 北京, p.433, 434, 1999.
20. 趙賢模 : 稀莖이 血壓과 血糖에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1998.
21. 權容駿 : 稀莖의 糖類에 關한 研究, 圓光大學校 碩士學位論文, 1970.
22. 鄭柱燮 : 稀莖의 水溶性 抽出物이 흰쥐의 藥物性 肝障害에 미치는 影響, 嶺南大學校 碩士學位論文, 1985.
23. Gilkeson GS, Ruiz P, Grudier JP, Kurlander RJ, Pisetsky DS. Related genetic control of inflammatory arthritis in congenic lpr mice, Clin Immunol Immunopathol, 53 (3) : 460-74, 1989.

24. 郭霽春 主編：黃帝內經素問校注, 人民衛生出版社, p.555, 556, 1996.
25. 陳記藩：金匱要略, 人民衛生出版社, p.168, 2000.
26. 南京中醫學院 校釋：諸病源候論校釋, 人民衛生出版社, p.40, 1983.
27. 王燕：外臺秘要, 人民衛生出版社, p.369, 1996.
28. 陳無擇：三因方, 翰成社, pp.121-123, 1977.
29. 李東垣 外：東垣十種醫書, 大星文化社, p.452, 1991.
30. 李梴：原本醫學入門, 大星文化社, p.370, 523, 1989.
31. 張介賓：景岳全書, 圖書出版 鼎談, p.218, 1999.
32. 龔廷賢：校訂增補萬病回春, 醫聖堂, p.315, 1993.
33. 程國彭：醫學心悟, 中國中醫出版社, p.139, 1999.
34. 王清任：醫林改錯, 一中社, pp.114-119, 1992.
35. 방약중 外：實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, pp.554-569, 1998.
36. Izui S, Kelley VE, Masuda K, Yoshida H, Roths JB, Murphy ED. Induction of various autoantibodies by mutant gene Ipr in several strains of mice, J Immunol, 133 (1) : 227-33, 1984.
37. E. Waaler : On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles, Acta Pathol. Microbiol. Scand, 17, pp.172-188, 1940.
38. Newkirk MM. : Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity, Clin Immunol, 104 (1) : 1-13, 2002.
39. Williams RC Jr. : Rheumatoid factors: historical perspective, origins and possible role in disease, J Rheumatol Suppl, 32 : 42-5, 1992.
40. Mannik M. : Rheumatoid factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, J Rheumatol Suppl, 32 : 46-9, 1992.
41. Ramsland PA, Movafagh BF, Reichlin M, Edmundson AB : Interference of rheumatoid factor activity by aspartame, a dipeptide methyl ester, J Mol Recognit, 12 (5) : 249-57, 1999.
42. Seigler HF : Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma, Proc Natl Acad Sci. 95, 13141-13146, 1998.
43. Sobol RE : A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gene-modified autologous melanoma cells, Cancer. 80, 401-412, 1997.
44. Gansbacher B : Immunization with HLA-A2 matched allogenic tumor cells that secrete interleukin-2 (NK cells) of patients with metastatic melanoma or metastatic renal cell carcinoma, Proc ASCO, 441, 1997. Keiji Miyazawa 外 : Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase, The Journal of Biological Chemistry Vol. 273, No. 38, pp.24382-24838, 1998.