加味大羌活湯이 Collagen Ⅱ로 유발된 관절염 생쥐모델에 미치는 면역학적 연구

김태영 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Immunogic Study on the Effect of Gamidaegang-tang on Collagen II-Induced Arthritis in Mice

Tae Young Kim, Min Seok Oh*

Department of Orental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

This study was carried out to know the immunological effect of GDGT on CIA(collagen induced arthritis) mice, a model of rheumatoid arthritis. For this purpose, GDGT was orally administerd to mice with arthritis induced by collagen II and then value of cytotoxicity on hFLSs and liver, the arthritis index, immunocyte in paw joint and DNL, rheumatoid factor (IgG and IgM), collagen II specific antibody in the serum were measured. The cytotoxicity were not shown on hFLSs and liver. The arthritis index decreased significantly after 3 week. In total cell counts of DLN and paw joint, there was a significant increase in DLN and significant decrease in paw joint. In DNL, $CD19^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD3^+/CD69^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD25^+$, $CD3^+/CD49b^+$ cells increased significantly. In Paw joints, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD25^+$cells decreased significantly. The level of serum IgG and IgM decreased significantly. The level of collagen II in the serum was decreased significantly. Marginal erosion, necrotic chodrocytes, cartilage and bone degradation were improved in histological section of paw joints. The results present significant immunological effect of GDGT on rats with arthritis induced by collgen II. So we expect that GDGT should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease.

Key words : gamidaegang-tang(GDGT), Rheumatoid arthritis, collagen induced arthritis, Immune cells

서 론

류마토이드 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 다양한 항원에 대한 자가면역 반응으로 연골과 관절 주위 조직이 침윤되고 파괴되어, 관절의 강직이나 변형이 초래되는 자가면역질환이다[1,2]. 전 인구의 약 1%가 류마토이드 관절염에 이환되어 있을 것으로 추정되며[3], 많은 류마토이드 관절염 환자들은 통증 뿐 아니라 관절의 기능장애와 신체장애, 이로 인한 직업장애를 겪고 있다[4].

류마토이드 관절염의 활막내에는 T 세포, 섬유아세포양 활막세포, 대식세포, 수지상세포, B세포, 비만세포, 파골세포 등이 침윤되어 있으며 이들 세포간의 상호작용에 의해 관절염이 진행되는 것으로 알려져 있다[5].

* 교신저자 : 오민석, 대전시 서구 둔산동 둔산한방병원 한방재활의학과교실
· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 042-470-9136

· 접수 : 2009/07/16 · 수정 : 2009/08/12 · 채택 : 2009/08/25

류마토이드 관절염에 대한 현대의학적인 치료는 비스테로이성 항염증 약물(NSAIDs), 부신피질 호르몬제, 항류마토이드 약물(DMARDs), 세포독성제, 면역억제제 등이 사용되고 있으나 장기사용으로 인한 위장관 장애, 피부발진, 불임, 골수기능억제, 간독성, 신독성, 폐독성, 안구합병증과 같은 약물부작용이 보고 되고 있어 사용시 정기적인 혈액검사와 주의가 필요하다[6].

한의학적으로 류마토이드 관절염은 제반 감각 운동장애를 총칭하는 痺症의 범주에 속하며[7], ≪東醫寶鑑≫[8]에 기재된 痛風, 痛痺, 白虎風, 歷節風도 모두 痺症에 해당된다. 한의학에서는 류마토이드 관절염의 원인을 風寒濕, 熱, 瘀血, 氣血虛, 陽虛, 陰虛로 파악하고 있으며, 치료법은 淸熱, 祛風散寒, 除濕活血, 養氣血, 補肝腎을 위주로 하고 있다[9].

류마토이드 관절염과 관련한 한약물에 대한 연구는 고[10]가 가미영선제통음, 곽[11]이 소풍활혈탕, 조[12]가 정통탕을, 이[13], 이[14], 김[15], 서[16], 신[17]이 대강활탕과 가미 대강활탕에 대해 발표하였다.

大羌活湯이 처음 기재된 문헌은 羅[18]의 ≪衛生寶鑑≫인데, 風濕相搏으로 인한 肢節疼痛, 不可屈伸한 증을 치료하며, 風濕이 침범하여 나타나는 頭身疼痛, 身體沈重, 肩背膝臗腫痛, 心下痞滿, 面色萎黃, 不欲飮食 等症에 祛風濕, 通經絡, 止痛의 효능이 있다고 하였다.

본 연구에서 사용한 加味大羌活湯은 大羌活湯에 金銀花, 蒲公英, 猪篾을 가미한 처방으로 가미한 약재 모두, 소염·진통 및 면역조절작용에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려져 있고[19-21], 임상적으로 류마토이드 관절염에 활용되는 경험방이다.

최근에 류마토이드 관절염에 대한 연구는 질환의 진행과정에서 T세포 및 B세포와 같은 임파구와 염증성 세포들을 포함하는 백혈구의 활성화와 이들의 관절로의 유입이 매우 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀내었다. 특히 류마토이드 관절염이 발생하는 부위인 활액막이나 관절내에서 유발유전자인 면역세포와 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β 등)의 단백질 구조와 기능이 밝혀지고 새로운 면역조절 물질이 발견되면서, 면역학적, 유전학적인 방법들이 주종을 이루고 있다[22].

이에 저자는 加味大羌活湯의 류마토이드 관절염에 대한 면역조절작용을 실험적으로 규명하기 위하여, collagen Ⅱ로 유발된 관절염 생쥐에 加味大羌活湯를 투여하여 매주 arthritis index를 측정하고, 관절의 염증상태를 분석하기 위하여 관절, 림프내의 총세포수와 형광유세포 분석을 통한 면역세포의 발현을 측정하고 ELISA법에 의한 혈청내 류마토이드 인자인 IgG, IgM을 측정하였으며, Hematoxylin & Eosin과 Masson-Trichrome 염색법으로 조직학적 검사를 시행한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물 및 사료

실험동물은 폴라스인터내셔날 (England)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J 마우스를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0 ± 2℃, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 식이는 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 가미대강활탕(GDGT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩(貼)의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1.).

2. 방법

1) 시료 추출

GDGT 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 후 (19.5 g), 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. The Prescription of Gamidaegangheal-tang (GDGT)

韓藥名	生 藥 名	(g)
金銀花	*Lonicerae Flos*	10
蒲公英	*Taraxaci Herba*	10
羌 活	*Angelicae koreanae Radix*	6
升 麻	*Cimicifugae Rhizoma*	3
獨 活	*Araliae Cordatae Radix*	3
蒼 朮	*Atractylodis Rhizoma*	3
防 己	*Stephaniae tetrandrae Radix*	3
威靈仙	*Clematidis Radix*	3
白 朮	*Atractylodis Rhizoma alba*	3
赤茯苓	*Hoelen rubra*	3
澤 瀉	*Alismatis Rhizoma*	3
甘 草	*Glycyrrhizae Radix*	3
川牛膝	*Achuranthis Radix*	6
鷄血藤	*Mucunae Caulis*	10
虎杖根	*Polygoni Cuspidati Radix*	6
豨 簽	*Siegesbeckiae Herba*	6
	Total amount	81

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs로 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10^4개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GDGT (최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ㎍/㎖)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 ㎕를 가하여 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액 (1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 ㎕를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base (100 ㎕)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5분간 흔들어 준 후 ELISA reader (Molecular devices, U.S.A)로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 기능 (LFT : liver function test) 측정

실험 종료 후 심장 채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 검사기관인 biotoxtech (주) (청원, 충북)에 의뢰하여 혈액 생화학 분석기 (Boichemistry analyer hitachi 7080, Japan)를 사용하여 ALT, AST를 측정하였다.

3) 류마토이드 관절염 생쥐 (CIA) 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type Ⅱ collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 ㎕를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을

피하주사로 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate를 투여한 군과 GDGT 약물 투여군으로 나누어 실험을 실시하였다.

4) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 8 마리를 한 군으로 하여 정상군, 치료제를 처리하지 않은 대조군, 그리고 양성대조군 methotrexate (MTX) (0.3 ㎎/㎏) 투여군, GDGT (8.1 ㎎/day)투여군으로 나누어 booster 한 후, 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 ㎎/㎏)를 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 복강에 주사하였으며, GDGT 실험군은 8.1 ㎎/day 농도로 4주 동안 매일 오전 11시에 경구 투여하였다.

5) Arthritis index (AI) 분석

DBA/1J Type II collagen으로 boosting 후 쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도를 1주일에 1회씩 검사하였다. (0=No arthritis, 1=Small degree of arthritis, 2=Light swelling, 3=Medium swelling, 4=Severe swelling)

6) Draining lymph node (DLN), paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 draining lymph node (DLN) 및 paw joint를 적출하였다. DLN은 100 mesh로 세포를 분리한 후 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer (Fal뷻 ()에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/㎖ (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고, 37℃ shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

7) 형광 유세포 분석

총세포수 측정에서 나타난 바와 같이, 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-B220를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 draining lymph node (DLN), paw joint에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

8) 혈청 내 rheumatoid factor (RF) 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IgG와 IgM을 kit로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척하였다. 여기에 HRP-conjugeted Avidin 100 ㎕를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 재세척하였다. 다시 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 ㎕의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II(CII) 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후 collagen II kit로 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/200 dilution)씩 분주하고, 12시간 동안 4℃ 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin- conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 이를 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugeteda Avidin 100 ㎕를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고, 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 병리 조직 검사

약물 투여 4주일 후에 각 실험군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세하였다. 이를 epoxy에 포맷한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

11) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100 ± 5.8 (%)로 나타난 반면, GDGT의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (㎍/㎖) 농도 투여군에서는 각각 90.8 ± 4.2, 95.8 ± 3.5, 97.6 ± 3.8, 115.6 ± 1.8, 124.5 ± 3.7 (%)로 나타났다 .

2. 간 기능에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT는 정상군이 37.3 ± 2.4 (U/L), 대조군이 30.3 ± 1.6 (U/L), MTX투여군에서는 155.7 ± 10.4 (U/L), GDGT 투여군에서는 35.8 ± 2.4 (I.U/L)로 나타났다. AST는 정상군, 대조군, MTX투여군, GDGT 투여군에서 각각 101.1 ± 2.1 (U/L), 92.0 ± 10.7 (U/L), 109.4 ± 4.6 (U/L), 83.9 ± 4.6 (U/L)로 큰 차이를 나타내지 않았다 .

3. 관절염 유발율에 미치는 영향

관절염 유발율을 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여부터 MTX 투여군과 GDGT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였고, 3주부터는 GDGT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 (**$p<0.01$) 감소를 나타내었으며, 4주에도 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 있는 (*$p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 1).

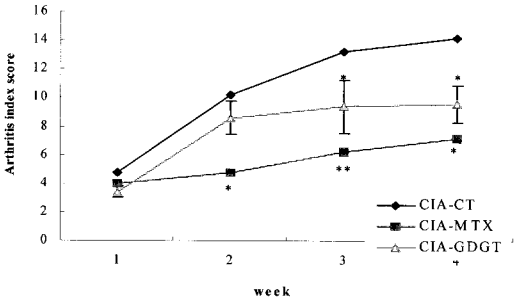

Fig. 1. Suppressive effect of GDGT on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored at every seven day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into three groups. CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (*p<0.05, **p<0.01).

4. DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 4주간 GDGT를 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군이 6.5 ± 1.60 ($\times10^6$), 대조군이 1.57 ± 0.24 ($\times10^6$), MTX 투여군이 4.96 ± 1.26 ($\times10^6$), GDGT 투여군이 8.9 ± 1.0 ($\times10^6$)로 나타나, 이 역시 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 2).

Paw joint에서는 정상군이 5.1 ± 0.9 ($\times10^6$), 대조군이 24.3 ± 2.7 ($\times10^6$), MTX 투여군이 12.9 ± 0.3 ($\times10^6$), GDGT 투여군이 11.4 ± 4.0 ($\times10^6$)로 나타나 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (**p<0.01) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

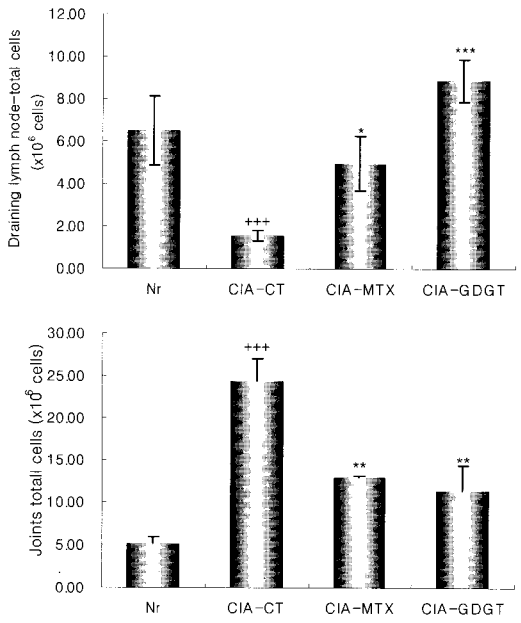

Fig. 2. Effect of GDGT on total cell number of DLN and paw joint in CIA mice. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen i.p injection and 8.1 mg/day/0.2ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. 면역세포에 미치는 영향

1) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) $CD19^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD19^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 19.1 ± 6.5 ($\times10^4$), 대조군이 6.4 ± 1.1 ($\times10^4$), MTX 투여군이 14.1 ± 3.5 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 33.0 ± 3.4 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 3).

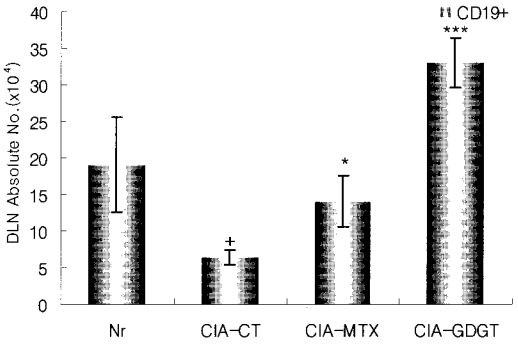

Fig. 3. Effects of GDGT on absolute number of $CD19^+$ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GDGT. The cells were incubated with anti-$CD19^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+p<0.05). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

(2) $CD3^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD3^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 43.8 ± 7.8 ($\times10^4$), 대조군이 7.7 ± 1.4 ($\times10^4$), MTX 투여군이 30.6 ± 5.6 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 44.7 ± 1.3 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 4).

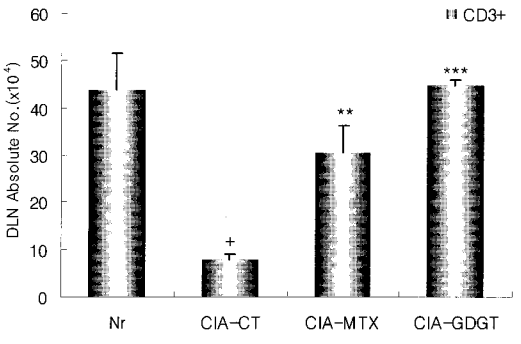

Fig. 4. Effects of GDGT on absolute number of $CD3^+$ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GDGT. The cells were incubated with anti-$CD3^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+p<0.05). Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

(3) $CD4^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD4^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 31.7 ± 7.3 ($\times10^4$), 대조군이 4.5 ± 0.4 ($\times10^4$), MTX 투여군이 20.9 ± 6.0 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 32.6 ± 5.2 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 5).

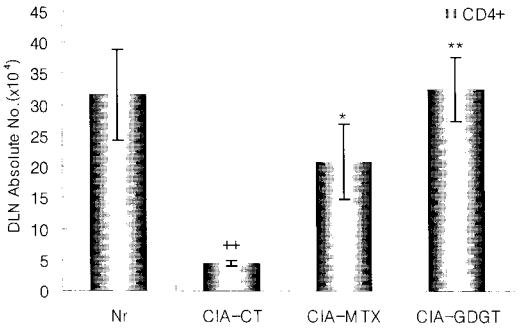

Fig. 5. Effects of GDGT on absolute number of $CD4^+$ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GDGT. The cells were incubated with anti-$CD4^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01).

(4) $CD3^+/CD69^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD3^+/CD69^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 3.9 ± 1.4 ($\times10^4$), 대조군이 1.6 ± 0.1 ($\times10^4$), MTX 투여군이 5.1 ± 1.1 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 7.0 ± 1.1 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다(Fig. 6).

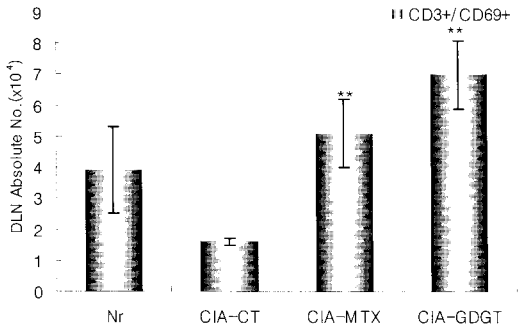

Fig. 6. Effects of GDGT on absolute number of $CD3^+/CD69^+$ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GDGT. The cells were incubated with anti-$CD3^+/CD69^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c. injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

(5) $CD8^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD8^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 10.9 ± 2.3 ($\times10^4$), 대조군이 2.1 ± 0.8 ($\times10^4$), MTX 투여군이 8.3 ± 1.4 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 11.2 ± 1.1 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 7).

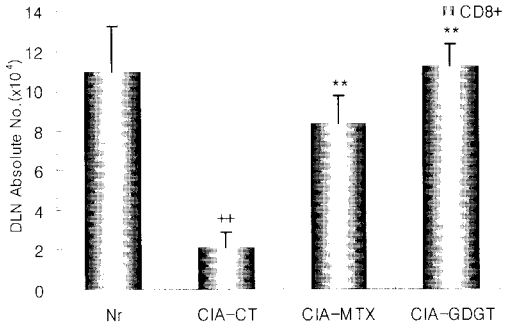

Fig. 7. Effects of GDGT on absolute number of $CD8^+$ cells in DLN of CIA mice. Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of GDGT. The cells were incubated with anti-$CD8^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

(6) $CD4^+/CD25^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD4^+/CD25^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 5.9 ± 1.5 ($\times10^4$), 대조군이 1.2 ± 0.1 ($\times10^4$), MTX 투여군이 3.5 ± 1.1 ($\times10^4$), GDGT 투여군이 5.2 ± 0.5 ($\times10^4$)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 8).

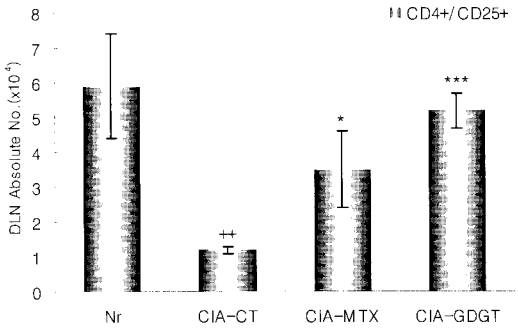

Fig. 8. Effects of GDGT on absolute number of $CD4^+/CD25^+$ cells in DLN of CIA mice. The cells were incubated with anti-$CD4^+/CD25^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

(7) $CD3^+/CD49b^+$ 세포 발현

DLN에서 $CD3^+/CD49b^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 2.1 ± 0.5 ($\times10^4$), 대조군이 0.5 ± 0.0 ($\times10^4$), MTX 투여군이 3.8 ± 0.1($\times10^4$), GDGT 투여군이 2.1

± 0.7 (×10⁴)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (*p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 9).

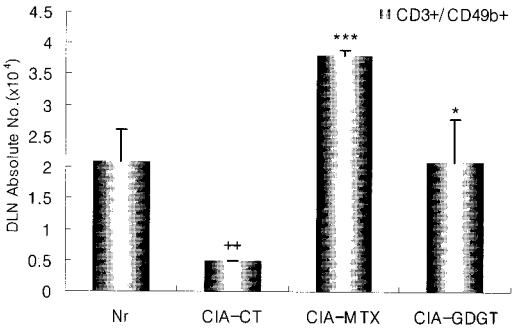

Fig. 9. Effects of GDGT on absolute number of $CD3^+/CD49b^+$ cells in DLN of CIA mice. The cells were incubated with anti-$CD3^+/CD49b^+$ and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

2) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) $CD3^+$ 세포 발현

Paw joint에서 $CD3^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 1.0 ± 0.3 (×10⁵), 대조군이 31.1 ± 2.0 (×10⁵), MTX 투여군이 4.6 ± 0.5 (×10⁵), GDGT 투여군이 2.5 ± 0.7 (×10⁵)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 10).

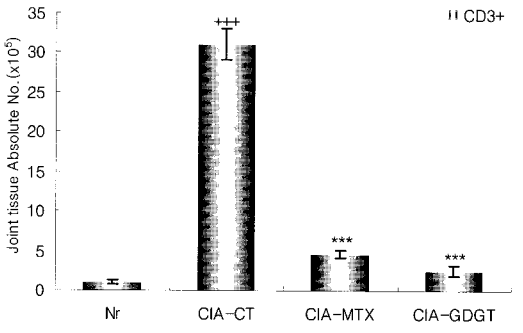

Fig. 10. Effects of GDGT on absolute number of $CD3^+$ cells in paw joint of CIA mice. Cells were incubated with anti-$CD3^+$ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr : Normal DBA/1J mouse group, CIA-CT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX(methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (***p<0.001).

(2) $CD4^+$ 세포 발현

Paw joint에서 $CD4^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 0.3 ± 0.1 (×10⁵), 대조군이 19.5 ± 0.5 (×10⁵), MTX 투여군이 2.1 ± 0.2 (×10), GDGT 투여군이 1.0 ± 0.2 (×10⁵)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 11).

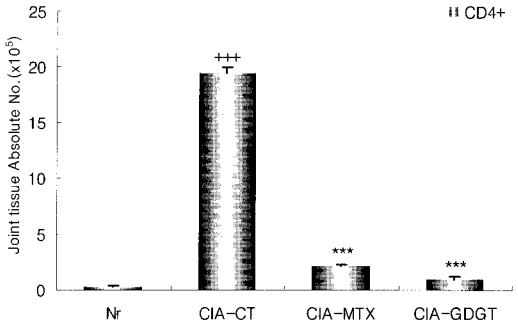

Fig. 11. Effects of GDGT on absolute number of $CD4^+$ cells in paw joint of CIA mice. Cells were incubated with anti-$CD4^+$ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (***p<0.001).

(3) $CD4^+/CD25^+$ 세포 발현

Paw joint에서 $CD4^+/CD25^+$ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 0.74 ± 0.2 (×10⁵), 대조군이 2.41 ± 0.1 (×10⁵), MTX 투여군이 2.34 ± 0.2 (×10), GDGT 투여군이 1.96 ± 0.2 (×10⁵)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12).

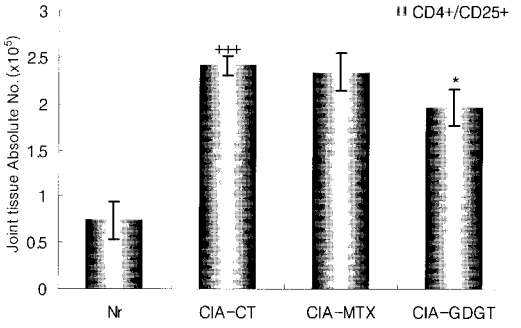

Fig. 12. Effects of GDGT on absolute number of $CD4^+/CD25^+$ cells in paw joint of CIA mice. Cells were incubated with anti-$CD4^+/CD25^+$ antibody and analyzed by flow cytometer. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 mg/kg i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ml oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05).

6. Rheumatoid factor(RF)에 미치는 영향

1) IgG 혈중 농도

IgG 혈중 농도는 정상군이 8.6 ± 4.0 (mU/㎖), 대조군이 207.3 ± 43.7 (mU/㎖), MTX 투여군이 106.0 ± 20.3 (mU/㎖), GDGT 투여군이 68.7± 23.5 (mU/㎖)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 13).

2) IgM 혈중 농도

IgM 혈중 농도는 정상군이 8.3 ± 3.1 (mU/㎖), 대조군이

36.9 ± 2.5 (mU/㎖), MTX 투여군이 31.2 ± 4.3 (mU/㎖), GDGT 투여군이 10.2 ± 6.2 (mU/㎖)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (**p<0.01) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 14).

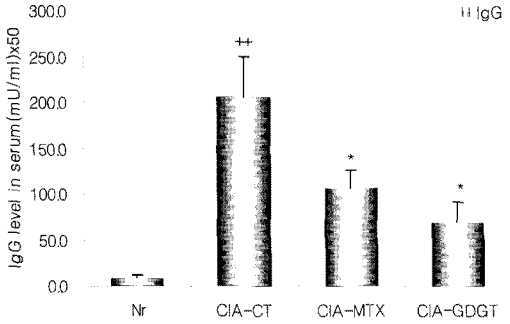

Fig. 13. Effects of GDGT on levels of total IgG in the serum of CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 ㎎/㎏ i.p. injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ㎖ oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05).

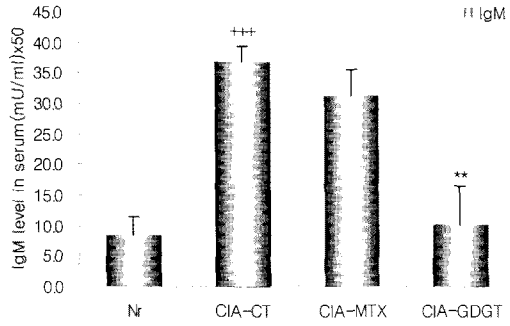

Fig. 14. Effects of GDGT on levels of total IgM in the serum of CIA mice. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 ㎎/㎏ i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ㎖ oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (**p<0.01).

7. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 1.1 ± 0.0 (U/㎖), 대조군이 41.7 ± 0.9 (U/㎖), MTX 투여군이 24.0 ± 2.5 (U/㎖), GDGT 투여군이 30.0 ± 4.5 (U/㎖)로 나타나, 대조군에 비하여 GDGT 투여군에서 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 15).

8. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GDGT를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다. Fig. 16의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직의가 진행되었다. 반면, MTX 처리군 (Fig. 16. C), GDGT (8.1 mg/day) (Fig. 16D) 투여군에서는 대조군에 현저하게 관찰된 족부 (paw)의 윤활관절강 (JC)에서의 염증을 관찰할 수 없어 상대적으로 감소하였다(Fig. 16)

2) Masson-Trichrome 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GDGT를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다. Fig. 17의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직에 collagen 침착이 진행되었고, 반면, MTX 처리군 (Fig. 17. C), GDGT (8.1 mg/day) (Fig. 17. D) 투여군에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 17)

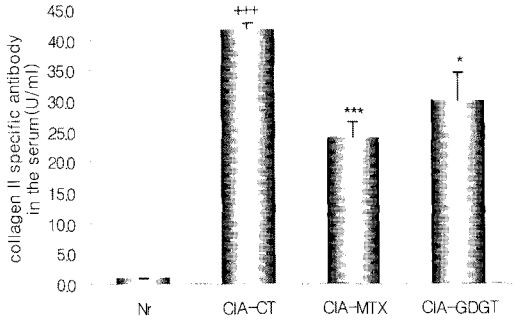

Fig. 15. Effects of GDGT on levels of collagen II specific antibody in the serum of CIA mice. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Nr (Normal): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 ㎎/㎏ i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ㎖ oral treated. Statistically significant value compared with normal by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

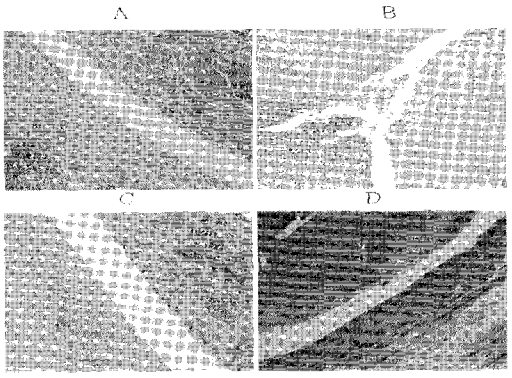

Fig. 16. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin. Nr (Normal, A): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control, B): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate, C): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 ㎎/㎏ i.p injection, GDGT : DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 8.1 mg/day/0.2 ㎖ oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications: X 200.

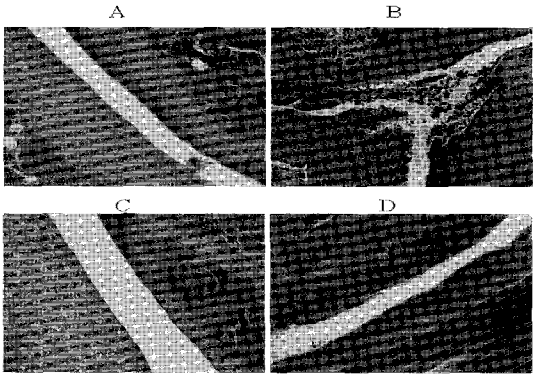

Fig. 17. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Meisson Trichrome staining. Nr (Normal, A): Normal DBA/1J mouse group, CT (Control, B): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection, MTX (methotrexate, C): DBA/1J mouse group with collagen s.c injection and 0.3 ㎎/㎏ i.p injection, GDGT(D) : DBA/1J mouse group with collagen s,c injection and 8.1 mg/day/0.2 ㎖ oral treated were analysis with histopathology of paw joints mg/day/0.2 ml oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications: X 200.

고 찰

류마토이드 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막조직의 만성 염증과 연골과 골파괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 초래하고, 보통 대칭적인 관절침습으로 인하여 통증, 부종, 압통이 관절 주위에 나타나며, 관절운동에 의해 통증이 악화되고 1시간 이상 지속되는 강직감이 나타나는 자가면역질환이다.[23]

류마토이드 관절염 환자의 관절 조직에서는 염증 세포의 침윤, 활막염, 활막 증식에 의한 pannus의 형성 및 혈관 신생 등이 발생하며, 일단 관절의 파괴가 진행되면 이를 억제시키기가 쉽지 않기 때문에 결국 병이 진행됨에 따라 운동제한 및 기능소실이 따르게 된다[24].

류마토이드 관절염의 발생은 항원 특이적 기전과 항원 비특이적 기전으로 나눌 수 있다[25]. 항원 특이적 기전의 경우, 원인이 되는 T 세포 항원이 아직 밝혀져 있지 않지만, 바이러스나 세균에 의한 것으로 추측되고 있는데, 공유항원결정기를 가진 류마토이드 관절염의 특이적 주조직 항원복합체(Major Histocompatibility Complex)가 관절염 유발 peptide를 T 세포에 제공하여 T 세포를 활성화시키고, 활성화된 T 세포가 자가 항원과 교차 반응하여 macrophage를 자극함으로써 관절염이 시작된다는 것이다. 한편 항원 비특이적 기전의 경우, 관절염의 발생은 반복되는 감염, 조직 손상, 알레르기, 예방 접종 등과 같은 비특이적 자극에 의해 활막내 macrophage가 활성화 되고, 활성화된 macrophage로부터 생산된 TNF-α나 GM-CSF 등의 cytokine들에 의해 수지상 세포의 분화가 유도되며, 분화된 수지상 세포가 강력한 항원 제시 세포로 작용하여 자가 항원을 자가 반응 T 세포에 전달함으로써 T 세포가 자극되어 관절염이 시작된다는 것이다. 두 기전에서 모두 관절염의 발생에 macrophage가 크게 관여하고 있는 것으로 여겨지고 있으며, 관절염이 유발된 후 활막에서 생산되는 cytokine들은 주변 분비 또는 자가분비로 작용하여 관절 염증의 악화와 만성적인 지속에 관여하는 것으로 알려져 있다[26].

서양의학적인 류마토이드 환자의 치료는 염증 활성도를 조절하여 관절손상의 진행을 막고, 질병의 완치보다 관해상태에 이르도록 하는데 초점을 맞추고 있다. 임상에서 빈번하게 사용되는 약물로 메토트렉세이트(methotrexate, N-10-methylaminopterin, 이하 MTX)가 있다. 빠르고 강력한 효과를 가지며, 비교적 안전하다고 알려져 있음에도, 간독성, 폐 섬유화, 골수억제 등의 부작용으로 인하여 정기적인 혈액검사가 필요하며, 환자의 30%에 있어서는 투약이 중단되는 실정이다[27].

류마토이드 관절염과 관련한 한약물에 대한 고[10], 곽[11]의 연구는 혈액학적인 성분 위주이고, 조[12]의 정통탕에 관한 연구만이 면역에 대한 언급 및 유의성이 있었고, 대강활탕 관련한 이[13], 이[14], 김[15], 서[16], 신[17]의 연구는 생체 외 실험 및 혈액학적인 연구만이 이루어져대강활탕 관련하여 면역 및 조직학적인 부분은 부족한 부분이 있는 실정이다.

한의학적으로 류마토이드 관절염은 그 病因病理와 임상증상으로 보아 痺症의 범주에 속한다[7]. ≪素問 · 痺論≫[28]에서 "風寒濕三氣雜至合而爲痺也"라 하여 風寒濕外邪가 痺症의 중요한 원인이라고 하였으며, ≪三因方≫[29]에서는 風濕이 相搏하거나 飮酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보았다.

상기한 문헌에 근거한 류마토이드 관절염의 치료법에 사용된 처방 중에, 본 연구에서 사용한 처방의 모태인 大羌活湯이 처음 기재된 羅[18]의 ≪衛生寶鑑≫에서 風濕相搏으로 안한 肢節疼痛, 不可屈伸, 身體沈重, 肩背膝臗腫痛, 心下痞滿, 面色萎黃, 不欲飮食 等症에 祛風濕, 通經絡, 止痛의 효능이 있다고 한 이래 임상에서 자주 활용되고 있다.

大羌活湯의 구성약물을 고찰해보면 羌活과 獨活은 味辛苦性溫하여 祛風勝濕止痛하고, 升麻는 味甘辛性微寒하여 升去淸熱解毒하고 威靈仙, 蒼朮, 防己는 味苦辛性溫하여 燥濕通絡溫發하고, 澤瀉와 茯苓은 利滲濕利尿하고, 甘草는 益氣緩急止痛하는 효능이 있어 이와 같은 구성약물이 조합되어 肢節腫痛을 비롯한 痺症을 치료하는 처방이 된다[30].

본 연구에서 선정한 加味大羌活湯(이하 GDGT)은 大羌活湯에 淸熱解毒 효능이 있는 金銀花, 蒲公英과 行血補血 舒筋活絡 효능이 있는 鷄血藤, 祛風濕 通經絡 효능이 있는 豨薟 등이 추가된 처방으로 관절염의 급성기 및 류마토이드 관절염에 다용하는 처방이다[19,21,31,32].

본 실험에서 GDGT의 세포독성을 관찰한 결과 hFCs에서는 GDGT의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ㎍/㎖ 농도에서 세포독성이 없었으며, 간독성 관찰 결과 역시 독성이 없었다. 특히 MTX대조군은 ALT가 유의하게 간독성을 나타냈지만 GDGT군은 정상군과 같은 정상범위였다.

GDGT의 세포독성과 간독성이 없음을 확인한 후 정상군과 CIA로 감작된 DBA/1J 대조군, MTX를 병용투여한 대조군, GDGT를 4주간 경구투여한 실험군으로 나누어 류마토이드 관절염에 미치는 영향을 알아보았다.

우선 DBA/1J를 Type II collagen으로 boosting 후 쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도를 1주일에

1회씩 검사하였다.

관절염 지수는 대조군에 비해 3주 이후부터 GDGT 투여군의 관절염 지수가 점차 감소함을 보였고, 4주 이후부터 GDGT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

류마토이드관절염의 활액조직은 혈관내막 대식세포와 섬유아세포양 활액세포수의 증가와 T세포, 세포질세포, 기타 활액내 세포들의 축적으로 특징지워진다. 침투된 활액세포는 다양한 사이토카인(L-1, IL-6. TNF-α 등)을 과잉생산하며, 고착분자와 단백질분해효소의 유전자 발현 등의 생산을 증가시킨다[33].

GDGT의 관절염 억제 작용과 연골보호 작용이 면역세포의 활성조절에 의한 것인지를 알아보기 위하여 임파절(DNL)과 족부관절(paw joint)에서의 총면역세포수를 측정한 결과 DLN에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2). paw joint에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

최근에 류마토이드 관절염의 발병 및 진행에 있어서 다양한 면역세포 표면분자들의 역할이 밝혀지고 있다. 기능적으로 독특한 림프구들은 독특한 유형의 세포표면 단백질을 발현하고 있는데, 면역학자들은 종종 이러한 표면분자를 검출하기 위하여 단클론 항체 탐침기를 이용한다. 단클론 항체에 의해 인식되는 세포표면 분자는 항체가 이들에 대해 만들어지므로 항원이라 부르거나 혹은 표지에 의해 각기 다른 림프구 집단간을 식별할 수 있고, 확인되기 때문에 표지자(marker)라 부른다. 과거에는 이들 표면표지자들이 이들과 반응하는 항체에 따라서 명명을 하여 큰 혼란을 야기하였다. 이를 해결하기 위해서, 우선적으로 인간의 백혈구에 대한 단일의 명명체계가 도입되었다. 이 체계에 따르면, 특정라인 혹은 분화단계를 확인하게 하고, 특징적인 구조를 가지며, 단클론항체 집단인 군(cluster0에 의해 인식되는 표면 표지자를 분화군의 구성원(member of a cluster of differentiation)이라 부르고, 구조가 알려진 모든 백혈구 표면 항원에는 CD약자가 주어지게 되었다(예. CD1, CD2). 이들 세포표면 단백질 분자들은 단지 표현형 표지자가 아니라 이들 자체가 다양한 림프구 반응에 참여한다는 것도 밝혀졌다. 다양한 CD항원은 세포와 세포간의 상호작용 및 부착을 증진하는 것과, 림프구를 활성화시키는 신호를 전달하는 것을 주된 기능으로 하고 있다[34].

본 실험에서는 DNL 내와 paw joint에서 CD19, CD3, CD4, CD69, CD25, CD49b의 세포발현에 대하여 알아보았다.

CD19 분자는 B세포의 수를 측정하는데 주로 사용하며, 항체를 직접 생산하여 외부물질을 중화시키는 체액성 면역반응에 관여한다. 또한 B세포 리셉터의 협조자(co-B cell Receptor)로서 CD21과 CD81복합체를 이루어 신호 형질유입의 역할을 하고, B세포의 발달과 활성화, 분화시의 신호전달에 관여한다[35]. DLN 내 $CD19^+$ 발현에서는 GDGT군이 대조군에 비해서 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 GDGT가 체액성면역에 관련된 B세포의 발달과 활성화, 분화시의 신호전달에 유의한 작용을 하는 것으로 판단할 수 있다.

CD3 분자는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 항원인식 신호를 세포안으로 전달하는 기능을 가지고 있고 성숙 T세포를 인지한다[34]. DLN 내 CD3발현에서는 GDGT군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 4). 또한 paw joint 내 CD3+ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 10). 이러한 결과는 GDGT가 DNL내에서는 T세포 활성화에 관여하고 paw joint에서는 T세포 활성을 억제하여 관절염 발병시에 면역작용을 증가시키면서도 활막조직에서의 자가면역반응은 억제하는 것으로 생각할 수 있다.

CD69 분자는 휴지기 임파절에서는 발현되지 않지만, T세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화 표지자로 사용될 수 있다. 주로 활성화된 T세포 및 B세포, 대식세포, NK세포에서 발현이 된다[36]. DLN 내 $CD3^+/CD69^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 GDGT가 염증반응 초기에 CD69분자가 CD3분자와 동반 발현하여 T세포 면역반응을 활성화하는 것으로 보인다.

CD49b 분자는 자가항원에 감작된 미성숙 수지상세포에 의해서 활성화되고 증식되는 세포로서 류마토이드 관절염과 같은 자가면역질환의 억제 작용을 나타내는 것으로 보고되었다[37].

DLN 내 $CD3^+/CD49b^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 9). 이러한 결과는 면역반응시에 CD49b의 증가로 자가면역질환의 활성화를 억제하여 관절염의 확대를 방지할 수 있는 가능성이 있다고 보여진다.

CD4/CD25세포는 조절 T세포로서 활성화된 T세포 면역체계를 조절한다고 알려져 있으며, IL-10이나 TGF-β를 분비함으로서 과도하게 활성화된 면역세포를 조절하는 것으로 보고되었다[38]. DLN 내 $CD4^+/CD25^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 8). 또한 paw joint 내 $CD4^+/CD25^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소 하였다(Fig. 12). 이러한 결과는 DNL에서 T세포를 활성화 하면서도 관절활막조직에서는 과도한 염증물질의 분비를 억제하는 기능이 있음을 보여주고 있다.

류마토이드 관절염이 발생하면 세포성 면역반응은 주로 T세포에 의하여 이루어지나, NK세포와 대식세포들에 의해서도 이루어지며, 이들 세포간에는 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다[39]. 따라서 T세포는 단백질 항원에 대한 특이 면역반응에서 중추적 역할을 한다고 할 수 있다. 이러한 세포매개 면역반응에서 CD4 T세포와 CD8세포가 주로 작용하는데 CD4 T세포는 보조 T세포로 작용하여 대식세포의 활성화에 관여하고, CD8 T세포는 억제 또는 독성작용을 하여 세포내 미생물에 감염된 세포를 파괴한다. 체액성 면역반응에서는 CD4 T세포는 B세포와 상호작용하여 이들 B세포의 증식과 분화를 자극하기도 한다[38].

한편 CD4 T세포는 MHC(주조직항원복합체) class Ⅱ 항원을 인식하여 작용하며 CD8의 T세포는 class Ⅰ 항원을 인식하고 작용한다. 또한 CD4, CD8 세포는 자가면역을 방지하는 역할을 하는 regulatory T cell로도 알려져 있다. 이러한 regulatory T cell의 존재는 조직에서 자가 면역을 일어나지 않게 하는 기능뿐만 아니라, 부적절한 조직의 제거에 있어서 자가 면역을 허용하는 기능까지 포함하고 있다[39].

DLN 내 $CD4^+$, $CD8^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 5, Fig. 7). 또한 paw joint 내 $CD4^+$ 발현에서는 GDGT 투여군이, 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11). 이러한 결과는 DNL에서의 T세포의 활성화 및 면역조절 작용을 증강시키고, 관절조직에서의 자가면역반응을 억제하는 것으로 사료된다.

류마토이드 관절염 환자의 B림프구는 혈청이나 관절 내에서 자가항체인 IgG, IgM를 분비하며 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로불린의 부위에 대한 자가항체인 류마토이드 인자를 생성한다[36]. 일단 IgG와 RF가 항원-항체 복합물을 형성하면 보체를 활성화시키는 화학 매개물이 방출되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활막세포 파괴와 염증반응을 일으킨다. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체내에서 류마토이드 관절염의 활동성과 유관한 지표가 되며, 이중 IgM-RF는 류마토이드 관절염 환자의 2/3에서 양성으로 나타나며, 측정이 용이하여 임상에서 주로 이용된다[41].

IgG 혈중 농도는 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13). IgM 혈중 농도도 GDGT 군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 14).

collagen Ⅱ은 관절연골의 주요구성 성분으로, 류마토이드 관절염의 병인에 있어 collagen Ⅱ에 대한 자가면역이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 발병 초기에 혈청과 활액막에 collagen Ⅱ 항체가 주로 존재하며, 염증반응을 반영하는 것으로 알려져 있다[40].

혈청 내의 collagen Ⅱ 항체량은 GDGT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 15).

본 실험에서 GDGT 군에서 B세포를 활성화시키는 CD19 분자는 DNL에서는 증가 되었지만, 혈청에서 류마토이드 인자인 IgG와 IgM의 형중농도는 유의하게 감소하였고, 콜라겐 특이적 항체생산도 유의성 있게 감소하는 것으로 보아 일관성 있게 자가면역질환을 억제하여 병리적 항체형성을 억제한다는 것을 나타내주고 있다고 할 수 있다.

관절의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 paw joint를 절개한 후 Hematoxylin & Eosin 염색을 한 후 현미경을 통하여 염증의 침윤과 대식세포, 과립구, 단핵구세포, pro-inflammation synovites 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투정도를 분석한 결과 대조군에서는 관절조직의 면역세포의 침투, 관절의 침윤, 활막의 손상, 활막세포의 과잉분열이 나타났지만, MTX 처리군, GDGT 투여군에서는 연골파괴나 염증증상을 발견할 수 없었다(Fig. 16). 또한 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 pannus의 결합조직 등을 분석한 결과 CIA 대조군에서는 collagen 침착이 진행되었지만, MTX 처리군, GDGT 투여군에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착, 활막 세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 17).

이상의 결과로 보아 GDGT 투여군에서 DNL 및 paw joint에서의 총 세포수, 관절염 유발율, 형광 유세포 분석을 통한 면역세포수, 혈청내 류마토이드 인자인 IgG, IgM의 생성량, 혈청내의 Collagen Ⅱ 항체농도가 CIA대조군에 비해 유의성 있는 결과가 나왔으며, 현미경을 통한 관절조직에서의 병리조직검사를 시행해 본 결과에서도 류마토이드 관절염에 효과가 유의한 것으로 확인되었으므로, 향후 이에 대한 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

加味大羌活湯(GDGT)이 collagen Ⅱ로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성 및 간독성, 관절염 유발율, DNL내와 paw joint의 총 세포수와 면역세포 발현, 혈청내 류마토이드 인자인 IgG와 IgM 생성량, 혈청내 collagen Ⅱ 항체량, 관절 조직학적 변화에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

hFCs에 대한 독성 실험에서 세포독성 및 간독성이 나타나지 않았다. 관절염 유발율은 3주부터 유의성 있게 감소하였다. 관절 DLN 내의 총 세포수는 유의성 있게 증가하였고, paw joint의 총 세포수는 유의성 있게 감소하였다. DNL내의 면역세포 $CD19^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD3^+/CD69^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD25^+$, $CD3^+/CD49b^+$는 유의성 있게 증가 하였다. Paw joint내의 면역세포 $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD25^+$는 유의성 있게 감소하였다. 혈청 내 IgG와 IgM의 생성량은 유의성 있게 감소하였다. 혈청 내 collagen Ⅱ 항체량은 유의성 있게 감소하였다. 관절 조직학적 소견에서 면역세포의 침투와 연골의 침윤, collagen 침착, 활막세포의 손상 및 염증이 상대적으로 감소하였다.

이상의 결과로 보아 加味大羌活湯이 collagen Ⅱ 유발 관절염에 대해 면역조절작용의 효과가 있다고 사료되며, 향후 임상에서의 연구 및 활용이 기대된다.

참고문헌

1. 홍연식, 김완욱, 이신석, 주영실, 민준기, 박성환. 류마티스 관절염 환자에서 제2형 콜라겐의 치료효과. 대한류마티스학회지 6(2):149-56, 1999.
2. 성진형, 류재덕, 김영훈, 김원유, 황희준, 김진영. 배양된 관절연골세포에 퇴행성 골관절염 및 류마티스 관절염의 관절액이 미치는 영향. 대한정형외과연구학회지 3(1):5-13, 2000.
3. Gabriel, S.E., Crowson, C.S,, O's, Fallon, W.M. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Mineesota, Arthritis Rheum. 42: 415-420, 1999.
4. Pincus, T., Callahan, L.F., Sale, W.G. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventyfive rheumatoid arthritis patients studied over nine years. Arthritis Rheum. 27: 864-872, 1984.
5. Chin, N., Tran, Steven, K., Lundy, David, A., Fox. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. Pathophysiology 12(3):183-189, 2005.
6. 이연아, 홍승제. 류마티스 관절염의 치신치료 지견. 경희의학, 23(1):7-14, 2007.
7. 정석희. 痺病의 문헌적 연구. 대한한의학회지 16(1):10, 1995.

8. 허준. 동의보감, 서울, 남산당, pp 365-378, 1989.
9. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학, 서울, 군자출판사, pp 78-99, 2005.
10. 고광재. 생체외 류마토이드 관절염 실험 모델에서 가미영선제통음의 효과. 원광대학교 대학원, 2003.
11. 곽중문. 소풍활혈탕가미방이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 관한 연구. 동의병리학회지 16(4):810-817, 2002.
12. 조종철. 정통탕이 콜라젠으로 유도한 관절염 동물 병태모델에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 21(1):39-49, 2007.
13. 이호근. 대강활탕이 제Ⅱ형 Collagen誘發 관절염의 항체에 미치는 영향. 경희대학교대학원 한의학석사학위논문, 1994.
14. 이수경. 생체외 류마토이드 관절염 실험 모델에서 가미대강활탕의 효과. 한방재활의학과학회지 12(1):17-29, 2002.
15. 김도식. 대강활탕의 소염·진통작용에 관한연구. 조선대학교 대학원 약학과석사학위논문. 1992.
16. 서윤정. 구성태. 양윤정 외. CEF에 의해 유도된 白鼠모델 관절염에서 大羌活湯의 鎭痛效果. 대한경락경혈학회지 21(4):83-99, 2004.
17. 申鉉大. 대강활탕의 이뇨·진통 및 소염효과에 관한 연구. 경희대학교대학원 한의학박사학위논문, 1982.
18. 羅天益. 衛生寶鑑. 북경, 인민위생출판사, pp 370-371, 1983.
19. 한재섭. 박희수. 金銀花藥鍼의 항암 및 면역반응에 관한 실험적연구. 대한침구학회지 23(4):205-218, 2006.
20. 고재왕, 태헌, 김준한, 류영수. 中樞神經系에서 蒲公英의 항염증작용에 관한 연구. 동의신경정신과 학회지 11(2):11-21, 2000.
21. 조영주. 豨薟이 炎症性 싸이토카인 및 류마티스양 關節炎에 미치는 影響. 大田大學校大學院, 2003.
22. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논문의 경향, 대한침구학회지 19(5):190-194, 2002.
23. 이문호. 내과학. 서울, 학림사, p 1695, 1986.
24. 대한정형외과학회. 정형외과학, 서울, 최신의학사, pp 123-131, 175-176, 2001.
25. Arend, W.P. Physiological of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 45: 101-106, 2001.
26. Firestein, G.S. Evoling concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 423: 356-361, 2003.
27. 박원. 류마티스관절염 환자에서 Methotrexate 부작용의 원인과 엽산대사. 대한내과학회지 67(2):109-112, 2004.
28. 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.
29. 陳無擇. 三因方3권, 大連, 國風出版社, pp 2-3, 1977.
30. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울, 의성당, p 276, 643, 1998.
31. 서해경, 오민석, 김동희. 류마토이드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應, 동의생리병리학회지 17(3):780-786, 2003.
32. 고재왕, 김태헌. 김준헌 등. 중추신경계에서 포공영의 항염증작용에 관한 연구. 동의신경정신과 학회지 11(1):11-21, 2000.
33. Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 14: 397-440, 1996.
34. Abul, K., Abbas Andrew, H., Lichtman Shiv, Pillai. 세포분자면역학 6판, 서울, 이퍼블릭, pp 51, 113, 144-146, 532-533, 2008.
35. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학, 서울, 정담출판사, pp 2071-2099, 2006.
36. Werfel, T., Boeker, E., Kapp, A. Rapid expression of the CD69 antigen onT cells and natural killer cells upon antigenenic stimulation of peripHeral blood mononuclear cell suspensions. Allergy. 52: 465-469, 1997.
37. Charbonmier, L.M., Duivenvoorde, L.M. and Apparally, F. Immature dendritic cell and natural killer cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells. J Immunol. 177: 3806-3813, 2006.
38. Gavin, M., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., et al. Homeostasis and anergy of $CD4^{(+)}CD25^{(+)}$ suppressor T cells in vivo. Nat Immuneol. 3: 33-41, 2002.
39. Naka, T., Nishimoto, N., Kishimoto, T. The paradigm of IL-6 from basic science to medicine, Arthritis Res. 4: 233-242, 2002.
40. 정영옥, 홍승재, 김호연. 류마티스 관절염 병인에서 제2형 콜라겐에 대한 면역반응의 역할. 대한면역학회지 3(1):1-7, 2003.
41. Timpl, R., Wolff, I., Wick, G., Furthmayr, H., Steffen, C. Immunogenicity and speccificity of collagen. VII. Differences between various collagens demonstrated by cross-reaction studies. J Immunol 10: 725-729, 1968.