

Original article

蒼朮桃仁湯加味方이 DBA/1J 생쥐의 collagen 유발 관절염 억제에 미치는 영향

박장우, 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Inhibitory Effects of *Changchuldoin-tanggamibang* on Collagen Induced Arthritis in DBA/1J Mouse

Jang-Woo Park, Min-Seok Oh

Dept. of Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was carried out to find the effects of *Changchuldoin-tanggamibang* (hereinafter referred to CDIT) on the inhibition of arthritis induced by collagen on DBA/1J mouse.

Methods: The experimental mice were divided into four groups: normal group (Nr), control group (CIA-CT), methotrexate group (CIA-MTX), and *Changchuldoin-tanggamibang* group (CIA-CDIT). Cytotoxicity, hepatotoxicity, arthritis index, value of immunocytes in draining lymph node and paw joint, and rheumatoid factor (IgG, IgM) in serum were measured in vivo.

Results:

1. Cytotoxicity against hFCs was not shown in any concentration.
2. Hepatotoxicity was low in the CDIT-treated group compared with the MTX group.
3. The arthritis index decreased significantly.
4. In total cell counts of DLN and paw joint, the cells in DLN increased significantly while there was a significant decrease in paw joint.
5. In lymph nodes, CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+, CD3+/CD49b+, and CD4+/CD44+ cells increased significantly, while B220+/CD23+, and CD11c+/MHC II+ cells decreased significantly.
6. In joints, CD3+, CD4+, CD4+/CD25+, and CD11b+/Gr-1+ cells decreased significantly.
7. The level of IgG decreased and the level of IgM significantly decreased compared with the control.
8. Anti-collagen II in serum decreased compared with the control.
9. Around the joint of the CDIT group, infiltration of inflammation, synovial hyperplasia, invasion of cytokine, of cartilage, deposition of collagen and synovial injury decreased compared with the control in histopathologic observation (HE, MT staining).

Conclusions: Comparison of the results for this study showed that CDIT had immunomodulatory effects. We expect that CDIT could be used as a effective drug for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune diseases. Therefore, we have to survey continuously, looking for effective substances and mechanisms in the future.

Key Words : *Changchuldoin-tanggamibang* (CDIT), rheumatoid arthritis, DBA/1J mouse, collage- induced arthritis, immunocytes

• Received : 1 September 2009 • Revised : 6 November 2009 • Accepted : 6 November 2009

• Correspondence to : 오민석 (Min-Seok Oh)

대전광역시 서구 둔산동 1136번지 둔산한방병원 재활의학과교실

Tel : +82-42-470-9424, Fax : +82-42-470-9008, E-mail : ohmin@dju.kr

서론

류마토이드 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 만성 활막염을 특징으로 하는 자가 면역 질환으로 활막염이 지속되면서 관절의 파괴와 변형을 초래한다¹⁾.

지역의 차이는 있으나 전 세계인구의 1~2%에서 이환되어 사회적, 경제적 및 개인적으로 삶의 질에 지대한 영향을 미치는 질병임에도 불구하고 아직 직접적인 원인은 규명되지 않고 있고, 자가 면역 질환의 하나로 인식되어 원인 항원에 대한 연구가 꾸준히 있어왔으나 결정적인 단서는 아직 찾지 못하고 있는 실정이다²⁾. 따라서 유엔(UN)과 세계보건기구(WHO)에서는 류마토이드 관절염으로 인해 증가하고 있는 건강관리상의 부담에 초점을 맞춰 새 천년의 첫 10년을 ‘골과 관절의 10년(Bone and Joint Decade)’으로 지정하고 류마토이드 관절염의 새로운 치료법 연구와 이 질환의 정복을 위한 신약 개발에 노력을 기울이고 있다.

한의학적으로 류마토이드 관절염은 痺症의 범주에 포함될 수 있으며, 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風 등으로 표현되어져 왔다³⁾. 최근 한의학계에서는 痺症, 歷節風 등에 사용되었던 한약 및 처방에 대해 류마토이드 관절염에 미치는 영향을 탐색하는 연구가 이어졌다. 연구 방식은 인체에서 자가면역과 관련된 연구를 위해 널리 사용되고 있는 type II collagen 유발 관절염 동물 모델을 통한 약물의 실험적 연구이다⁴⁾.

실험적 연구가 행해진 collagen 유발 관절염에 대한 처방으로는 疎風活血湯加味⁵⁾, 桂枝芍藥知母湯⁶⁾, 大羌活湯⁷⁾, 三痺湯⁸⁾ 등이 있는데, 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 소견을 비교하는데서 탈피하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다⁹⁾.

蒼朮桃仁湯加味方은 《蒼濟證方》¹⁰⁾의 관절염 처방인 蒼朮桃仁湯에 이미 단미제로서 류마토이드 관절염에 대한 실험적 효과가 입증된 鷄血藤^{11,12)}, 豨薟¹³⁾, 玄胡索¹⁴⁾을 가미한 처방으로 류마토이드 관절

염에 유의한 효과가 있을 것으로 기대되었다. 이에 蒼朮桃仁湯加味方이 류마토이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, type II collagen으로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능에 미치는 영향, arthritis index, draining lymph node(DLN)와 paw joint 내 총세포수에 미치는 영향과 면역세포에 대한 형광 유세포 분석, 혈청 내 rheumatoid factor(RF) 분석, 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정, 조직학적 변화 등을 관찰한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 폴라스인터내셔널(서울, 한국)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J 생쥐 32마리를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2℃, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 蒼朮桃仁湯加味方(이하 CDIT라 칭함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 아래와 같다(Table 1).

3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete Freund's adjuvant, methotrexate(MTX), 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, trypan blue, ethyl ether, collagenase, diethyl pyrocarbonate(DEPC), tris base, trypsin-0.2% EDTA, 2,7-dichloro-dihydro-

Table 1. The Composition of *Changchuldoin-tanggambang*(CDIT)

Korean name	Pharmaceutical name	Amount(g)
山紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	18.75
白芍藥	<i>Paeoniae Radix alba</i>	5.6
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	3.75
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	3.75
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	3.75
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	3.75
威靈仙	<i>Clematidis Radix</i>	3.75
陳皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	3.75
川芎	<i>Ligustici Rhizoma</i>	3.75
羌活	<i>Angelicae koreanae Radix</i>	3.75
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	3.75
防己	<i>Stephaniae Tetrandrae Radix</i>	3.75
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	3.75
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	3.75
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	3.75
赤茯苓	<i>Hoelen rubra</i>	2.62
龍膽草	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	2.25
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.87
谿血藤	<i>Mucunae Caulis</i>	12
豨薟	<i>Siegesbeckiae Herba</i>	8
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	6
Total amount		105.84

fluorescindiacetate(DCFH-DA), RPMI 1640, chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, D-PBS(Sigma Co., U.S.A.), IgG, IgM, collagen II 항체 kit(Scientific Pierce Co., U.S.A.), FBS(Hyclone Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Gibco Co., U.S.A.), PE-anti-CD3e, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, FITC-anti-CD23, FITC-anti-MHC II, FITC-anti-CD44(BD-pharm-ingen Co., U.S.A.)를 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기(Daewoong Co., Korea), microwave oven(LG Co., Korea), flow cytometer(Becton Dickinson Co., U.S.A.), spectrop-

hotometer(Shimadzu Co., Japan), centrifuge(Hanil Co., Korean), deep freezer(Sanyo Co., Japan), heating block, ice-maker(Vision Co., Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench(Vision scientific Co., Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-114 Co., Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540 Co., Japan), autoclave(Sanyo Co., Japan), imager system(Kodak Co., U.S.A.), plate shaker (Lab-line Co., U.S.A.), ELISA reader(Molecular devices Co., U.S.A.) 및 homogenizer(OMNI Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

CDIT 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml을 가하

여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치(rotary evaporator, Büchi B-114, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 후(26 g), 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs로 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0×10^4 개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 CDIT(최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μl 를 가하여 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액(1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 μl 를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base(100 μl)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 nm에서 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 biototech (주)(청원, 충북)에 의뢰하여 혈액 생화학 분석기 (biochemistry analyer hitachi 7080, Japan)를 사용하여 ALT, AST를 측정하였다.

3) Collagen 유발 관절염(CIA) 생쥐 모델

콜라겐 유발 관절염(collagen induced arthritis, CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 μl 를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 피하주사로 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다.

4) 실험군의 분류 및 시료 투여

실험군은 크게 DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군(normal, Nr)과 CIA를 유발시킨 후 약제를 투여하지 않은 대조군(control, CIA-CT), CIA를 유발시킨 후 methotrexate (MTX)를 투여한 양성대조군(CIA-MTX)과 CIA를 유발시킨 후 CDIT를 투여한 처치군(CIA-CDIT)으로 나누어 실험을 실시하였다.

정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX(0.3 mg/kg)를 4주간 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 복강에 주사하였으며, CDIT 실험군은 10.8 mg/day(400 mg/kg) 농도로 4주간 매일 오전 11시에 0.2 ml 씩 경구 투여하였다.

5) Arthritis index(AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율(incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도를 1주일에 1회씩 4주간 검사하였다

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

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 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(Falcon)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고, 37°C 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 μ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척하였다. 여기에 HRP-conjugated avidin 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 재세척하였다. 다시 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

collagen II 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후 collagen II kit로 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μ l(1/200 dilution)씩 분주하고, 12시간 동안 4°C 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 이를 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugated avidin 100 μ l를

처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고, 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 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 포매한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

11) 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.0 for Windows, U.S.A.)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였고, 모든 측정치는 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 로 표시하였다.

성 적

1. 안전성 검사

1) 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 $100 \pm 5.8(\%)$ 로 나타난 반면, CDIT의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 투여군에서는 각각 86.3 ± 2.1 , 90.7 ± 3.4 , 91.1 ± 3.3 , 98.2 ± 2.8 , $102.2 \pm 2.9(\%)$ 로 나타나 세포독성이 없었다

2) 간독성에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT는 정상군이 37.3 ± 2.4 (U/L), 대조군이 30.3 ± 1.6 (U/L), 양성 대조군인 MTX에서는 155.7 ± 10.4 (U/L), CDIT 투여군에서는 27.1 ± 4.0 (U/L)로 나타났다. AST는 정상군, 대조군, 양성대조군, CDIT 투여군에서 각각 101.1 ± 2.1 (U/L), 92.0 ± 10.7 (U/L), 109.4 ± 4.6 (U/L), 110.9 ± 10.9 (U/L)로 큰 차이를 나타내지 않았다.

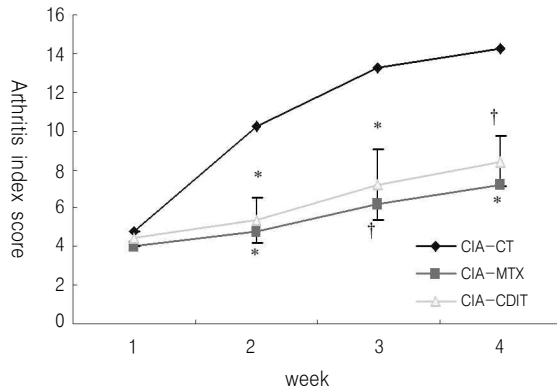


Fig. 1. Suppressive effect of CDIT on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into three groups(* $p<0.05$, † $p<0.01$).

2. 관절염 지수에 미치는 영향

관절염 지수를 매주 한 번씩 4주 간 검사한 결과, 시료 투여부터 MTX 투여군과 CDIT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였고, 3주 부터는 MTX 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성($p<0.01$) 있는 감소를 나타내다가, 4주 부터는 CDIT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성($p<0.01$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 1).

3. DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J 생쥐에 4주간 CDIT를 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군이 $6.5 \pm 1.60 (\times 10^6)$, 대조군이 $1.57 \pm 0.24 (\times 10^6)$, MTX 투여군이 $4.96 \pm 1.26 (\times 10^6)$, CDIT 투여군이 $5.1 \pm 0.5 (\times 10^6)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성

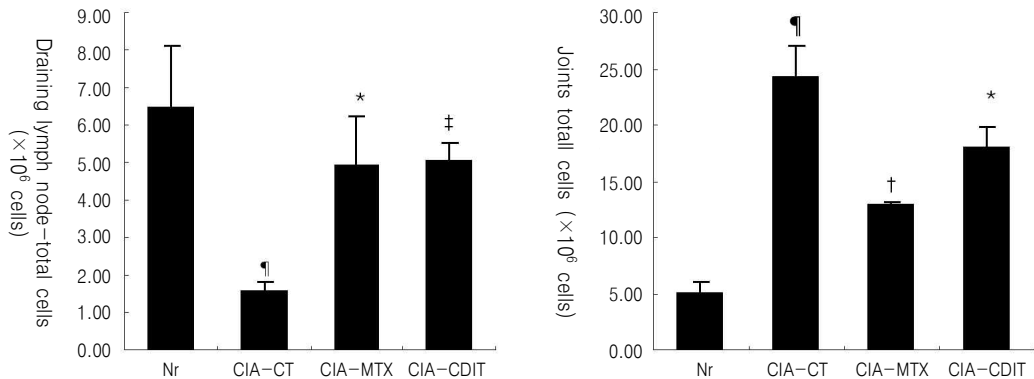


Fig. 2. Effect of CDIT on total cell number of DLN and paw joint in CIA mice. Statistically significant value compared with normal by t-test(† $p<0.001$). Statistically significant value compared with control by t-test(* $p<0.05$, † $p<0.01$, ‡ $p<0.001$).

($p<0.001$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 2).

Paw joint에서는 정상군이 $5.1 \pm 0.9 (\times 10^6)$, 대조군이 $24.3 \pm 2.7 (\times 10^6)$, MTX 투여군이 $12.9 \pm 0.3 (\times 10^6)$, CDIT 투여군이 $18.0 \pm 1.8 (\times 10^6)$ 로 나타나 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

4. 면역세포에 미치는 영향

1) DLN 내 CD19+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD19+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $19.1 \pm 6.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $6.4 \pm 1.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $14.1 \pm 3.5 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $22.1 \pm 4.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

2) DLN 및 paw joint 내 CD3+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $43.8 \pm 7.8 (\times 10^4)$, 대조군이 $7.7 \pm 1.4 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $30.6 \pm 5.6 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $25.4 \pm 7.0 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

5.6 ($\times 10^4$), CDIT 투여군이 $25.4 \pm 7.0 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2). 반면, Paw joint에서는 정상군이 $1.0 \pm 0.3 (\times 10^5)$, 대조군이 $31.1 \pm 2.0 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $4.6 \pm 0.5 (\times 10^5)$, CDIT 투여군이 $4.3 \pm 0.2 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

3) DLN 및 paw joint 내 CD4+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $31.7 \pm 7.3 (\times 10^4)$, 대조군이 $4.5 \pm 0.4 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $20.9 \pm 6.0 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $18.6 \pm 6.7 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2). 반면, Paw joint에서는 정상군이 $0.3 \pm 0.1 (\times 10^5)$, 대조군이 $19.5 \pm 0.5 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.1 \pm 0.2 (\times 10^5)$, CDIT 투여군이 $2.8 \pm 0.02 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p<0.001$)

Table 2. Effects of CDIT on Absolute Number of Immunocyte in Lymph Nodes

	normal	control	CIA-MTX	CIA-CDIT
DLN 내 CD19+	$19.1 \pm 6.5 (\times 10^4)$	$6.4 \pm 1.1 (\times 10^4)^{\S}$	$14.1 \pm 3.5 (\times 10^4)^*$	$22.1 \pm 4.1 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 CD3+	$43.8 \pm 7.8 (\times 10^4)$	$7.7 \pm 1.4 (\times 10^4)^{\S}$	$30.6 \pm 5.6 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$25.4 \pm 7.0 (\times 10^4)^*$
paw joint 내 CD3+	$1.0 \pm 0.3 (\times 10^4)$	$31.1 \pm 2.0 (\times 10^4)^{\S}$	$4.6 \pm 0.5 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$4.3 \pm 0.2 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 CD4+	$31.7 \pm 7.3 (\times 10^4)$	$4.5 \pm 0.4 (\times 10^4)^{\parallel}$	$20.9 \pm 6.0 (\times 10^4)^*$	$18.6 \pm 6.7 (\times 10^4)^*$
paw joint 내 CD4+	$0.3 \pm 0.1 (\times 10^4)$	$19.5 \pm 0.5 (\times 10^4)^{\S}$	$2.1 \pm 0.2 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$2.8 \pm 0.02 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 CD8+	$10.9 \pm 2.3 (\times 10^4)$	$2.1 \pm 0.8 (\times 10^4)^{\parallel}$	$8.3 \pm 1.4 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$6.4 \pm 1.1 (\times 10^4)^*$
DLN 내 CD3+/CD8+	$10.1 \pm 1.6 (\times 10^4)$	$1.7 \pm 0.3 (\times 10^4)^{\parallel}$	$7.7 \pm 0.6 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$6.2 \pm 0.3 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 CD3+/CD69+	$3.9 \pm 1.4 (\times 10^4)$	$1.6 \pm 0.1 (\times 10^4)$	$5.1 \pm 1.1 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$2.8 \pm 0.4 (\times 10^4)^*$
DLN 내 CD4+/CD25+	$5.9 \pm 1.5 (\times 10^4)$	$1.2 \pm 0.1 (\times 10^4)^{\parallel}$	$3.5 \pm 1.1 (\times 10^4)^*$	$2.9 \pm 0.4 (\times 10^4)^{\ddagger}$
paw joint 내 CD4+/CD25+	$0.74 \pm 0.2 (\times 10^5)$	$2.41 \pm 0.1 (\times 10^5)^{\S}$	$2.34 \pm 0.2 (\times 10^5)$	$1.2 \pm 0.4 (\times 10^5)^{\ddagger}$
DLN 내 CD3+/CD49b+	$2.1 \pm 0.5 (\times 10^4)$	$0.5 \pm 0.0 (\times 10^4)$	$3.8 \pm 0.1 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$1.3 \pm 0.3 (\times 10^4)^*$
DLN 내 CD4+/CD44+	$18.3 \pm 4.7 (\times 10^4)$	$2.7 \pm 0.2 (\times 10^4)^{\parallel}$	$13.0 \pm 2.6 (\times 10^4)^{\ddagger}$	$9.9 \pm 1.5 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 B220+/CD23+	$8.0 \pm 0.1 (\times 10^4)$	$17.7 \pm 1.6 (\times 10^4)^{\S}$	$12.9 \pm 0.8 (\times 10^4)^*$	$7.5 \pm 0.5 (\times 10^4)^{\ddagger}$
DLN 내 CD11c+/MHC II+	$1.46 \pm 0.1 (\times 10^4)$	$2.8 \pm 0.7 (\times 10^4)$	$1.7 \pm 0.7 (\times 10^4)$	$0.8 \pm 0.3 (\times 10^4)^*$
Paw joint 내 CD11b+/Gr-1+	$1.6 \pm 0.2 (\times 10^5)$	$126.4 \pm 1.6 (\times 10^5)^{\S}$	$47.8 \pm 3.5 (\times 10^5)^{\ddagger}$	$55.2 \pm 8.6 (\times 10^5)^{\ddagger}$

Statistically significant value compared with control by t-test ($^*p<0.05$, $^{\S}p<0.01$, $^{\ddagger}p<0.001$). Statistically significant value compared with normal by t-test ($^{\ddagger}p<0.05$, $^{\parallel}p<0.01$, $^{\#}p<0.001$)

있는 감소를 나타내었다(Table 2).

4) DLN 내 CD8+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD8+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $10.9 \pm 2.3 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.1 \pm 0.8 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $8.3 \pm 1.4 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $6.4 \pm 1.1 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2)

5) DLN 내 CD3+/CD8+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3+/CD8+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $10.1 \pm 1.6 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.7 \pm 0.3 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $7.7 \pm 0.6 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $6.2 \pm 0.3 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

6) DLN 내 CD3+/CD69+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3+/CD69+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $3.9 \pm 1.4 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.6 \pm 0.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $5.1 \pm 1.1 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $2.8 \pm 0.4 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

7) DLN과 paw joint 내 CD4+/CD25+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $5.9 \pm 1.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $1.2 \pm 0.1 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $3.5 \pm 1.1 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $2.9 \pm 0.4 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2). 반면, Paw joint에서는 정상군이 $0.74 \pm 0.2 (\times 10^5)$, 대조군이 $2.41 \pm 0.1 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $2.34 \pm 0.2 (\times 10^5)$, CDIT 투여군이 $1.2 \pm 0.4 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

8) DLN 내 CD3+/CD49b+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3+/CD49b+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $2.1 \pm 0.5 (\times 10^4)$, 대조군이 $0.5 \pm 0.0 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $3.8 \pm 0.1 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $1.3 \pm 0.3 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

9) DLN 내 CD4+/CD44+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4+/CD44+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $18.3 \pm 4.7 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.7 \pm 0.2 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $13.0 \pm 2.6 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $9.9 \pm 1.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

10) DLN 내 B220+/CD23+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 B220+/CD23+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $8.0 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군이 $17.7 \pm 1.6 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $12.9 \pm 0.8 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $7.5 \pm 0.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

11) DLN 내 CD11c+/MHCII+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD11c+/MHCII+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $1.46 \pm 0.1 (\times 10^4)$, 대조군이 $2.8 \pm 0.7 (\times 10^4)$, MTX 투여군이 $1.7 \pm 0.7 (\times 10^4)$, CDIT 투여군이 $0.8 \pm 0.3 (\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

12) Paw joint 내 CD11b+/Gr-1+ 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD11b+/Gr-1+ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 $1.6 \pm 0.2 (\times 10^5)$, 대조군이 $126.4 \pm 1.6 (\times 10^5)$, MTX 투여군이 $47.8 \pm 3.5 (\times 10^5)$, CDIT 투여군이 $55.2 \pm 8.6 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서

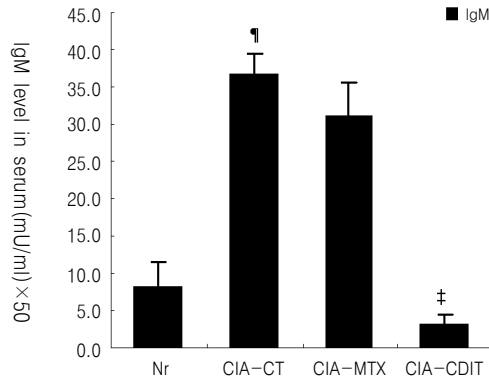


Fig. 3. Effects of CDIT on levels of total IgM in the serum of CIA mice. Statistically significant value compared with normal by t-test ($p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by t-test ($p < 0.001$).

유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

5. Rheumatoid factor(RF)에 미치는 영향

1) IgG 생성량에 미치는 영향

IgG 혈중 농도는 정상군이 8.6 ± 4.0 (mU/ml), 대조군이 207.3 ± 43.7 (mU/ml), MTX 투여군이 106.0 ± 20.3 (mU/ml), CDIT 투여군이 136.6 ± 5.5 (mU/ml)로 나타나, 대조군에 비해 CDIT 투여군이 감소는 했으나 통계적 유의성은 보이지 않았다.

2) IgM 생성량에 미치는 영향

IgM 혈중 농도는 정상군이 8.3 ± 3.1 (mU/ml), 대조군이 36.9 ± 2.5 (mU/ml), MTX 투여군이 31.2 ± 4.3 (mU/ml), CDIT 투여군이 3.2 ± 1.1 (mU/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

6. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 1.1 ± 0.0 (U/ml), 대조군이 41.7 ± 0.9 (U/ml), MTX 투여군이 24.0 ± 2.5 (U/ml), CDIT 투여군이 38.0 ± 2.4 (U/ml)로 나

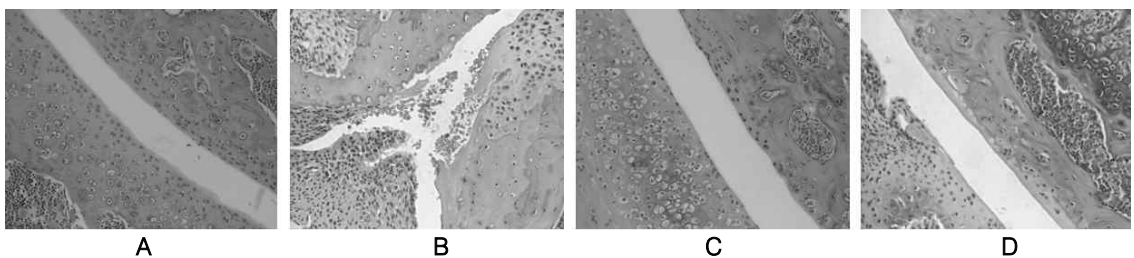


Fig. 4. Histological section of paw joints(Hematoxylin & Eosin staining) from CIA mice

- A : Normal DBA/1J mouse group
- B : Collagen-induced Arthritis (control)
- C : CIA + Methotrexate(0.3 mg/kg)
- D : CIA + CDIT(10.8 mg/day/0.2ml)

DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin staining. Cross-section of the Hindpaw from a Murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse(A), control: murine CIA(B), MTX(C), CDIT(D) were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. Original magnifications: $\times 200$.

타나, 대조군에 비하여 CDIT 투여군에서 감소했으나 통계적 유의성은 보이지 않았다.

7. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, CDIT를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia 정도를 분석하였다. Fig. 4의 B는 대조군으로 collagen II로 유발된 관절에 염증세포의 침윤과 활막세포의 증식이 진행되었다. 반면, MTX 처리군(Fig. 4, C)과 CDIT 투여군(Fig. 4, D)에서는 대조군에 비해 염증의 침윤과 활막세포의 증식이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4)

2) Masson-Trichrome 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, CDIT를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다. CDIT(Fig. 5, D) 투여군에서 대조군(Fig. 5, B)에 비해 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포

의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

류마티오이드 관절염은 원인 불명의 만성적인 전신성 질환으로, 특징적 양상은 말단 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염이며, 연골의 파괴와 골미란을 일으키고 결국 관절의 변형을 초래한다²⁾.

류마티오이드 관절염의 병인과 병태생리에 대해서 아직은 명확한 결론이 없이, 유전적 감수성과 감염의 가능성을 추정해 왔으나 면역학과 분자생물학의 발전으로 현재 병인으로 가장 지지를 받는 이론은 자가 면역 반응이며 초기 병변으로 미세혈관의 손상과 활액 세포의 수적 증가를 특징으로 한다^{1,15)}.

류마티오이드 관절염의 면역 병리학적 기전에 주목하는 이유는 관절조직의 국소 면역 반응을 나타내는 특징으로서 단핵세포(monocyte)의 침윤과 염증이 발생한 활액막에서 CD4+, plasma cell, macrophage 등이 증가되며, 활액 내에 다양한 cytokine이 분비되는 세포성 면역체계의 작동과 동시에 관절 및 혈액에 자가 항체가 존재하는 것으로 IgG 항체의 Fc 부분에 특이성을 갖는 류마티스 항체 외에 항핵항체, 항-collagen, 항-histone, 항-heat shock protein(HSP) 등에 의한 체액성 면역체계가 함께 작동하면서 이들

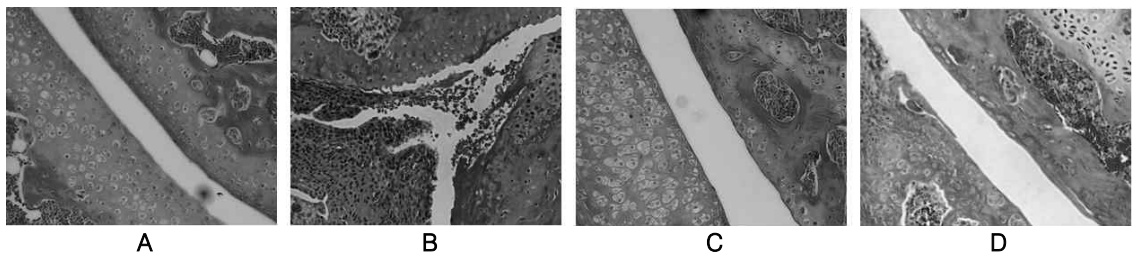


Fig. 5. Histological section of paw joints(Masson-Trichrome staining) from CIA mice

- A : Normal DBA/1J mouse group
- B : Collagen-induced Arthritis (control)
- C : CIA + Methotrexate(0.3 mg/kg)
- D : CIA + CDIT(10.8 mg/day/0.2ml)

DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Masson-Trichrome staining. Cross-section of the Hindpaw from a Murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse(A), control; murine CIA(B), MTX(C), CDIT(D) were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. Original magnifications: × 200.

의 상승 혹은 길항 작용에 의하여 복합적인 면역 연쇄 작용을 일으키기 때문이다^{16,17)}

류마토이드 관절염은 한의학적으로는 痺症의 범주에 속한다고 볼 수 있다³⁾. 《素問·痺論》¹⁸⁾에 “風寒濕三氣雜之，合而爲痺也”라 한 이래 여러 문헌에서 痺症에 대해 언급하는데, 이러한 痺症의 범주에서 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風 등은 슬관절, 족관절, 주관절, 완관절 및 수족지 관절 등에 극심한 통증과 종대, 변형 등의 증상을 일으켜 결국 운동제한을 야기하는 질환으로 류마토이드 관절염이나 통풍성 관절염의 임상 증상과 유사한 질환으로 여겨지고 있다¹⁹⁾.

한의학적 관점에서의 류마토이드 관절염의 원인은 虛實에 따라 風寒濕, 熱, 瘀血, 氣血虛, 陽虛, 陰虛 등이 있고 치료는 虛實에 따라서 清熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血 하거나 調營衛, 養氣血, 補肝腎한다⁴⁾.

류마토이드 관절염의 치료법으로 서양의학에서는 휴식, 진통소염제, 스테로이드제 등을 사용했다가 류마토이드 관절염이 면역질환임이 알려지면서 면역반응에 변화를 주는 약물로 금제제가 관절염 치료에 도입되었고, 이후 항말라리아제, 설과살라진 등이 도입되었다. 이후 메소트렉세이트(methotrexate : MTX)와 같은 면역억제제가 류마토이드 관절염의 치료에 도입되면서 관절염 치료에 큰 발전을 가져왔다. 최근에는 분자생물학의 발전으로 인해 류마토이드 관절염의 원인이 조금씩 밝혀짐에 따라 생물학적인 치료제가 개발되어 임상에서 이용되고 있다²⁰⁾. 최근 치료 개념은 ‘기회의 창(Window of opportunity)’ 개념²¹⁾과 ‘조기 적극적 치료’ 전략으로서, 발병 초기부터 항류마티스 약제(DMARDs)를 적극적으로 사용하는 것이 관절 손상을 억제할 수 있으며 일반적으로 증상 시작 2년 이내를 기회의 창으로 말하고 있다.

항류마티스제제로 가장 선호되는 약물은 MTX로, 항류마티스 약물 중 작용시기가 1~2개월로 비교적 빠르고, 강력한 효과를 가지며, 효과에 비해 비교적 안전하게 장기간 사용할 수 있는 장점이 있다. 그래서 많은 류마티스 내과 전문의들은 질병 활성도가

높은 류마토이드 관절염 환자에서 일차적 항류마티스 약제로 MTX를 선택하고 있다²²⁾. 그래서 본 논문에서도 이를 양성 대조군으로 설정하였다. 그러나 MTX는 심각한 간독성, 폐 섬유화, 골수억제, 구내염 등을 초래할 수 있으므로, 신기능 저하, 간질환, 심각한 폐질환 등이 있는 경우에는 이의 사용을 피하는 것이 좋다²³⁾. 또한 사용 중 정기적으로 CBC, LFT, creatinine을 추적 검사해야 한다²⁴⁾.

이렇듯 서양 의학의 류마토이드 관절염 치료제는 아직 완전하지 않으며 부작용을 가지고 있으므로, 기존의 류마토이드 관절염 치료제에 대한 부작용을 줄이거나 효용성을 높이려는 노력이 속출하면서 천연물 개발에 관심이 새롭게 모아지고 있는 실정이다²⁵⁾.

류마토이드 관절염의 전통적인 한방 약물 치료는 급성기인 實證과 만성기인 虛證으로 나누어 치료한다²⁶⁾.

급성기인 실증에는 관절부위에 통증이 옮겨 다니며 관절이 붉게 붓고 열감이 있으며 입이 마르며 맥이 뜨고 빠른 증상이 나타난다. 이때에는 열을 내리고 혈액순환을 좋게 하여, 몸에서 風과 습한 기운을 제거해 주는 효능을 갖고 있는 疎風活血湯, 大羌活湯, 靈仙除痛飲 등의 처방을 가감해서 활용을 한다²⁶⁾.

만성기인 허증에는 관절에 동통이 지속적이고 관절 부위의 피부가 청색 혹은 자색을 띠고 손마디가 구부러지고 혹이 여기저기서 만져지며 머리가 어지럽고 식은 땀이 나고 몸을 움직이기가 곤란한 증상을 나타내는데, 이때에는 氣血과 肝腎의 기능을 보하고 자양하는 효능이 있는 八物湯, 四六湯, 黃芪防風湯, 三氣飲 등의 처방을 가감해서 활용한다²⁶⁾.

현대 한의학 분야에서도 류마토이드 관절염 치료에 대한 동물 실험을 통한 약물 연구가 활발한데, 동물 실험 모델로 대표적인 것으로 adjuvant 유발 관절염과 collagen 유발 관절염이 있다. Type II collagen 유발 관절염은 Trentham 등에 의해 1977년에 처음 발표된 이후로, 인체에서 자가면역과 관련된 연구를 위해 널리 사용되어지고 있다⁴⁾.

실험적 연구가 행해진 adjuvant 유발 관절염에 대한 처방으로는 血府逐瘀湯²⁷⁾, 防風湯²⁸⁾, 疎經活血湯

合黃連解毒湯²⁹⁾, 行濕流氣散³⁰⁾ 등이 있으며, collagen 유발 관절염에 대한 처방으로는 疎風活血湯加味⁵⁾, 桂枝芍藥知母湯⁶⁾, 大羌活湯⁷⁾, 三痺湯⁸⁾ 등이 있는데, 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 조건을 비교하는데서 탈피하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다⁹⁾.

이러한 류마티오이드 관절염의 한방 약물 치료에 대한 노력의 일환으로 본 논문에서도 유효한 효과에 예상되는 처방인 蒼朮桃仁湯加味方¹⁰⁾으로 실험적 연구를 시행하였다.

蒼朮桃仁湯加味方은 《蒼濟證方》¹⁰⁾의 관절염 처방인 蒼朮桃仁湯에 이미 단미제로서 실험적 효과가 입증된 鷄血藤^{11,12)}, 豨薺¹³⁾, 玄胡索¹⁴⁾을 가미한 처방으로, 구성은 山紫草 18.75g, 白芍藥 5.6g, 當歸, 生地黃, 蒼朮, 桃仁, 威靈仙, 陳皮, 川芎, 羌活, 防風, 防己, 白芷, 薏苡仁, 木通 각 3.75g, 赤茯苓 2.62g, 龍膽草 2.25g, 甘草 1.87g, 鷄血藤 12g, 豨薺 8g, 玄胡索 6g 이다. 이 중 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하는 효능이 있으며, 류마티오이드 관절염 환자의 활막세포와 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 효과가 있음이 보고되었다^{11,12)}. 豨薺은 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒하는 효능이 있으며, 항류마티즘 작용의 치료 기전에 대한 연구와 염증성 cytokine 및 류마티오이드 관절염에 효과가 있음이 보고되었다¹³⁾. 玄胡索은 活血散瘀, 止痛하여 胸脇脘腹疼痛, 跌撲腫痛을 치료한다¹⁴⁾.

저자는 蒼朮桃仁湯加味方이 류마티오이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, type II collagen으로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능에 미치는 영향, arthritis index, draining lymph node(DLN)와 paw joint 내 총세포수에 미치는 영향과 면역세포에 대한 형광 유세포 분석, 혈청 내 rheumatoid factor(RF) 분석, 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정, 조직학적 변화를 분석하였다.

CDIT의 세포독성 측정결과, 모든 농도에서 세포독성이 없었다(Fig. 1). AST(aspartic transaminase)와 ALT(alanine transaminase)는 간세포 내에 있는 효소들로, AST는 특히 심근과 간에 많고, ALT는

간과 신장에 많은데, 둘 다 간세포가 손상을 받게 되면 혈액 내로 흘러나와 간세포의 손상을 반영해주는 간접적인 지표이다. 일반적으로 ALT는 AST와 평행하게 상승되는데 심근경색, 알콜성 만성간염, 간경화증, 간전이, 간에서의 울혈성 변화 때는 AST의 상승만은 못하다. 그러나 간괴사와 급성간염 때는 ALT가 AST 보다 높아진다³¹⁾. 간기능에 미치는 영향에서는, 양성대조군이 급격한 ALT의 상승을 보였음에 반해 CDIT 투여군은 큰 변화를 보이지 않았으며, AST 수치는 양성대조군과 CDIT 투여군 모두 큰 변화를 보이지 않았다. 여기서 CDIT가 양성대조군인 MTX에 비해 급성적인 간독성을 나타내지 않음을 추정해 볼 수 있다.

본 실험에서 관절염 지수는 시료 투여부터 MTX 투여군과 CDIT 투여군에서 대조군에 비해 감소함을 보였고, 3주 부터는 MTX 투여군의 관절염 지수가, 4주 부터는 CDIT 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어 모든 CIA에서 관절염이 유발되었으나 MTX 투여군과 CDIT 투여군에서 대조군보다는 억제되었다.

DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타낸 반면, paw joint에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

위의 결과는 CDIT 투여군이 DLN에서 면역 세포의 불균형을 조절하여서 정상 쥐와 비슷한 세포수를 유지하며 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포가 관절로 유입되는 것을 억제할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

면역시스템은 크게 체액성면역과 세포성면역으로 구분되고 있으며 현대적 실험연구는 항체가 관여하지 않고 T 세포가 중심이 되는 세포성 면역을 중심으로 연구되고 있는데, 이와 관련된 세포는 크게 T 세포, B 세포 및 macrophage 등으로 나눌 수 있으며, 면역반응은 이들 세포의 상호관계에 의하여 일어난다고 볼 수 있다^{32,33)}.

주로 혈관변화, 부종 및 호중구의 침윤을 동반하

는 급성 염증과는 대조적으로 만성 염증의 가장 중요한 특징적 소견은 대식세포 림프구 및 형질세포의 침윤, 섬유모세포와 소혈관의 증식, 섬유화 및 조직의 파괴 등이다³⁴⁾. 만성 염증성 질환의 하나인 류마티드 관절염에서도 활액막에 활액세포가 증식하고, 많은 림프구와 어느 정도의 형질세포 그리고 대식세포가 침윤된다²⁾.

가장 많이 침착하는 세포는 T 림프구이다. T 림프구는 표면 marker와 작용의 차이에 의해 두 가지 아집단, 즉 림프구의 활성화를 촉진하는 CD4+ Th 림프구와 표적세포를 파괴하는 CD8+ Tc 림프구로 나누어지며 이들은 각각 MHC class II 항원, MHC class I 항원에 구속되어 항원을 식별하는 T 세포 수용체를 가진다^{32,33)}.

CD19 세포는 B 세포의 수를 측정하는데 주로 사용하며, 항체를 직접 생산하여 외부물질을 중화시키는 체액성 면역반응에 관여한다. 또한 CD19는 B 세포에 있고 B 세포 리셉터의 협조자(co-B cell receptor)로서 CD21과 복합체를 이루어 신호 형질유입의 역할을 하고, B 세포의 발달 초기부터 형질세포(plasma cell)의 최종 분화까지 발현 된다³⁵⁾.

CD3 세포는 T 세포 수용체(TcR)에 결합하여 항원인식 신호에 따르는 신호를 세포핵에 전달하는 중요한 역할을 맡고 있다³⁶⁾.

CD4+ T 세포는 보조 T 세포이고, CD8+ T 세포는 억제 T 세포 또는 세포독성 T 세포로 CD4, CD8은 T 림프구를 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있으나 모든 T 세포 표면에 표현되는 표식인자로 CD3+가 있다³³⁾. 말초 T 림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다³³⁾.

CD3 세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 있으며, CD69는 휴지기 임파절에서는 발현되지 않지만, T 세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화인자로 불리는 세포표면 단백질이며, 활성화된 T 세포 및 B 세포, 대식세포, NK 세포에서도 발현이 된다^{35,36)}. T 세포와 내피세포 간의 상호작용에 있어서 T 세포를 활성화시키는데 CD69 같은 다양한 표면 표시 인자들의 발현이 증가된다³⁵⁾.

본 실험에서 CD19+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 2).

본 실험에서 CD3+, CD4+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가한 반면 paw joint에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 2).

본 실험에서 CD8+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 2).

본 실험에서 CD3+/CD8+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 2).

본 실험에서 CD3+/CD69+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 2). 위의 결과는 CDIT 투여군이 DLN에서 세포발현이 증가하는 경향을 보여 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 CDIT 투여군이 paw joint에서 세포발현이 감소하는 경향을 보여 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포들이 관절로 유입되는 것을 억제하는 것으로 보인다.

CD4+CD25+ T 세포는 자가면역을 방지하는 역할을 하는 regulatory T cell로 알려져 있다. 이러한 regulatory T cell의 존재는 조직에서 자가 면역을 일어나지 않게 하는 기능뿐만 아니라, 부적절한 조직의 제거에 있어서 자가 면역을 허용하는 기능까지 포함하고 있다³⁷⁾.

B 세포에서는 높은 수준의 CD44+ 세포가 나타나며 이러한 CD44+ 세포는 DLN 조직들이 제자리를 찾아오게 하는 중간에 반응하는데 그 표면에서 반응한다¹⁾. 또한 CD49b+ 세포는 자가 항원에 감작된 미성숙 수지상 세포에 의해서 활성화 되고 증식되는 세포로서 RA와 같은 자가 면역성 질환의 억제 작용을 나타내는 것으로 보고되었다³⁸⁾.

CD23+ 세포는 45kD의 세포표면분자로 알레르기 비염이나 알레르기 천식등 알레르기 질환에서 IgE

생성 및 염증반응에 연관된다. 항원에 의해 유도되는 IgE 합성이 알레르기 질환의 중심적 양상이고, 뒤따르는 IgE와 항원의 상호작용은 알레르기에 연관된 증상과 관계있다. IgE 생성은 다양한 활성을 보이는 세포표면분자 CD23에 의해 조절된다. CD23을 통한 allergen-loaded IgE에 의해 세포들이 활성화되면 IL-1, IL-6, TNF- α 가 생성된다³⁹⁾. B220+ 세포는 사람에게는 없지만 생쥐의 B 세포 표면에 있는 표식자이다³³⁾.

특히 CD4+/CD25+ 세포와 CD49b+ 세포는 조절 T 세포로서 이들이 활성화된 T 세포 면역 체계를 조절한다고 알려져 있다^{38,40)}.

본 실험에서 CD4+/CD25+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가한 반면 paw joint에서는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 2).

본 실험에서 CD3+/CD49b+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (Table 2).

본 실험에서 CD4+/CD44+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (Table 2).

본 실험에서 B220+/CD23+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 2).

위의 결과는 CDIT 투여군의 세포 발현이 DLN에서 증가하며 paw joint에서 감소하는 것으로 보아 CDIT 투여가 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다.

CD11a는 백혈구에서 발현되고, CD18과 짝을 이루며 부착과 세포의 이동작용을 한다. CD11b는 단핵세포, 과립구, NK세포에서 발현되는 세포표면분자로서, 이 세포들은 염증 시에 제일 먼저 도착하는 혈구들로 신체에 침투한 항원에 대한 탐식작용이 기본 기능이다⁴¹⁾. 또한 류마토이드 관절염 환자의 활막조직에서는 염증반응으로 인하여 CD11b+의 발현이 증가되어 있다고 보고되고 있다⁴²⁾. Gr-1+에 강한

양성반응을 보이는 세포들은 과립백혈구들이다⁴¹⁾. CD11c+는 사이토카인의 생성을 차단한다고 알려져 있다⁴³⁾.

본 실험에서 CD11c+/MHCII+ 세포 발현을 측정된 결과 DLN에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 2).

본 실험에서 CD11b+/Gr-1+ 세포 발현을 측정된 결과 paw joint에서 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 2).

위의 결과는 관절염이 발생한 관절 조직에서는 CD11b+/Gr-1+ 세포의 수가 급격하게 감소한 것으로 보아 CDIT가 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T 세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제하는 것으로 보인다.

류마토이드 관절염 환자의 B 림프구는 혈청이나 관절 내에서 자가항체인 IgG, IgM 등과 항원에 따른 항체를 분비하며, 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로블린의 Fc 부위에 대한 자가항체인 류마토이드 인자를 생성한다. 일단 IgG와 RF가 항원 항체 복합물을 형성하면 보체를 활성화시키는 화학 매개물이 방출되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활막세포 파괴와 염증반응을 일으킨다^{17,44)}. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체 내에서 류마토이드 관절염의 활동성과 유관한 지표가 되며, 이중 IgM-RF는 류마토이드 관절염 환자의 2/3에서 양성으로 나타나며, 측정이 용이하여 임상에서 주로 이용된다³¹⁾.

본 실험에서 IgG 혈중 농도는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 감소했으나 통계적 유의성은 보이지 않았다 (Fig. 3). IgM 혈중 농도는 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어 CDIT에 의하여 면역반응이 억제 조절되었음을 알 수 있었다 (Fig. 3).

본 실험에서 collagen II 항체량은 CDIT 투여군이 대조군에 비하여 감소했으나 통계적 유의성은 보이지 않았다.

류마토이드 관절염에서 주요 병리적 징후는 proinflammatory cytokine에 의해 자극받고 MMPs에 의

해 관절에 염증이 발생하고 연골의 골 흡수가 형성되는 것이다. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연접부 침식에 의해 발생한다. 이는 주로 IL-1, TNF- α 등의 염증 전구 cytokine에 반응한 대식세포나 섬유세포에 의해 생산되는 MMPs(주로 collagenase인 MMP-1, stromelysin인 MMP-3)에 의해 파괴된다⁴⁵⁾.

Hematoxylin & Eosin 염색은 조직의 구조를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰한 결과 CDIT 투여군에서 대조군에 비하여 염증의 침윤과 활막세포의 증식이 감소하였다 (Fig. 4).

Masson-Trichrome 염색은 교원섬유의 축적정도를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰한 결과 CDIT 투여군에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 감소하였다(Fig. 5).

이상의 결과로 보아 蒼朮桃仁湯加味方은 면역반응을 조절하여 염증을 억제시키는 작용이 있어 류마티드 관절염을 위시한 염증성 자가면역질환에 유효한 것으로 판단되며, 향후 이에 대한 지속적 연구와 임상적 응용이 필요할 것으로 사료된다.

결론

蒼朮桃仁湯加味方이 류마티드 관절염에 미치는 영향을 규명하고자 type II collagen으로 유발된 관절염 생쥐에서 세포독성, 간기능, arthritis index, DLN 및 paw joint 내 총세포수, 면역세포 분석, 혈청 내 rheumatoid factor(RF) 분석, 조직학적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성 및 간독성은 나타나지 않았다.
2. 관절염 지수를 유의성 있게 감소시켰다.
3. DLN 및 paw joint의 총세포수 관찰에서 DLN에서는 유의성 있게 증가하였고 paw joint에서는 유의성 있게 감소하였다.
4. 림프 내 CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/

CD8+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+, CD3+/CD49b+, CD4+/CD44+ 발현은 유의성 있게 증가하였고, B220+/CD23+, CD11c+/MHC II+ 발현은 유의성 있게 감소하였다.

5. 관절 내 CD3+, CD4+, CD4+/CD25+, CD11b+/Gr-1+ 발현은 유의성 있게 감소하였다.
6. 혈청 내 IgG는 감소하였으나 유의성은 없었고, IgM은 유의성 있게 감소하였다.
7. Collagen II 항체량은 감소하였으나 유의성은 없었다.
8. 조직학적으로 관절 주변에서의 염증의 침윤, 활막의 증식, 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 및 활막세포의 손상이 감소하였다.

이상의 결과로 보아 蒼朮桃仁湯加味方은 collagen II로 유발된 생쥐의 관절염에 면역학적으로 유효한바, 향후 많은 임상적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Harrison translation and compilation committee . Harrison's principles of internal medicine. Seoul:Jungdam publishing company. 2006: 2148-57.
2. The Korean orthopaedic. orthopedics. 5th edition. Seoul:Choishin medical republishing company. 2005:175-6.
3. The Korean academy of oriental rehabilitation medicine. Oriental rehabilitation medicine. Seoul:Koonja publishing company. 2005:78-99.
4. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med. 1977;146(3):857-68.
5. Gwak JM, Oh MS, Park JO, Kim DH. A study on the effects of Sopunghwalhyeoltang-gamibang on the inhibition of arthritis induced by collagen on the mouse. Korean journal of oriental physiology and pathology. 2002;16(4):810-7.
6. Shin BH, Lee JS, Shin HD. Effects of

- Kyegijakyakjimotang on antibody of type II collagen-induced arthritis. *Journal of oriental physio therapeutics*. 1994;4(1):121-31.
7. Lee HK, Jung SH, Kim SS. Effects of Daiganghwal-tang on change of IgG anticollagen antibody in type II collagen-induced arthritis. 1994;4(1):87-94.
 8. Jeong SH, Kim SJ. Effects of Sambi-tang on arthritis induced by collagen in rats. 2000;10(1):173-83.
 9. You HS. A study of 73 master's and doctoral theses on the arthritis of the oriental medicine[a master's thesis]. Dae-joen: Graduate school of Dae-joen university; 2001.
 10. Shin KH. *Changjejeungbang*. Seoul:Samjangwon. 1990:142.
 11. Choi JS, Song TW. A study on the effects of *Spatholobus suberectus* Dunn on the inhibition of arthritis induced by collagen on the mouse. *Korean journal of herbology*. 2003;18(3):79-88.
 12. Seo HK, Oh MS, Kim DH. Immunity responses of the *Spatholobus suberectus* Dunn to the Synovial cell isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Korean journal of physiology and pathology*. 2003;17(3):780-6.
 13. Jo YJ, Kim SH, Park JO, Kim DH. The effects of *Siegesbeckia* Herba on rheumatoid arthritis induced by collagen in MRL/MpJ-Ipr-Ipr mice. *Korean journal of physiology and pathology*. 2003;17(2):403-11.
 14. Park DS, Ahn BC, Ahn CJ. The analgesic effect of aqua-acupuncture with *Corydalis Tuber*, *Olibanum Mastix* & *Myrrha*. *The journal of korean acupuncture and moxibustion*. 1994;11(1):145-58.
 15. James. B. Wyngaarden. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia:WA Saunders company. 1992:1508-15.
 16. Abbas AK, Andrew H, Lichtman. *Cellular and Molecular Immunology*. Seoul:Bummoonsa. 2004:185,423.
 17. Varbanova BB, Baleva M, Nikolov K, Mihailova D. Prevalence of IgM, IgA and IgG-Rheumatoid Factors in Seronegative Polyarticular Disease Compared to Pauciarticular Disease in Juvenile Chronic Arthritis as Measured by ELISA. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1999;455:61-8.
 18. Yang YG, editors. Translation and annotation of *Huangdi neijing suwen*. publishing company. 1984:95-6, 328-36.
 19. Huh Jun. *DongEuiBoGam*. Seoul:Namsandang. 1989:365-78.
 20. Yang HI. Recent advance in rheumatoid arthritis therapy *Kyung Hee Mediicine*. 2004;20(1):1-3.
 21. Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):1771-4.
 22. Lee YA, Hong SJ. Current Strategies in treating rheumatoid arthritis. *Kyung Hee Mediicine*. 2007;23(1): 7-14.
 23. Alarcon GS, Kremer JM, Macaluso M, Weinblatt ME, Cannon GW, Palmer WR, et al. Risk factors for methotrexate-induced lung injury in patients with rheumatoid arthritis. A multicenter, case-control study. *Methotrexate Lung Study Group. Ann Intern Med*. 1997;127(5):356-64.
 24. Li E, Brooks P, Conaghan PG. Disease-modifying antirheumatic drugs. *Curr Opin Rheumatol*. 1998;10(3):159-68.
 25. Choi DY, Lee JD, Baek YH, Lee SS, Yu MC, Han JS, et al. Recent trends of immunologic studies of herbal medicine on rheumatoid arthritis. *The journal of korean acupuncture and moxibustion*. 2004;21(4):177-96.
 26. Lim JK. *Oriental Physio therapeutics*. Seoul:Komunsa. 1986:268.
 27. Jeh JJ. Experimental studies of the *Hyulbuchug-aotang* on the arthritis induced by Freund's complete adjuvant in rat[a master's thesis]. Seoul: Graduate school of Kyung-hee university;

- 1993.
28. Shin MS, Lee JS. Experimental studies of the Bangpungtang on the induced arthritis by Freund's complete adjuvant in rats. *Journal of oriental physio therapeutics*. 1994;4(1):135-46.
 29. Kim SJ, Lee CW. The experimental study of Samgium and Samgium(except Kyungpobuja) on the affecting of free radical generating system by adjuvant arthritis induced rats. *Journal of oriental rehabilitation medicine*. 1997;7(2):1-45.
 30. Lee SH. An experimental study on the effect of Hangseubyukisan on adjuvant arthritis[a master's thesis]. Dae-jeon: Graduate school of Dae-joen university; 1992.
 31. Lee KB. *clinicopathologic handbook*. Seoul: Komunsa. 2003:102-5,233-5.
 32. Jung TH, Kim JC, Kim MK. Lecture on advanced immunology. Daegu:Publishing department of Kyung buk university. 1996: 10,22,25, 77,193,200,215,248,357,211-2,232-5.
 33. Kim SJ. *Immunology*. Seoul:Goryeo Medicine. 1994:3,8,18,25-32,114,134,148-50,157-8,206.
 34. The Korean society of pathologists. *Pathology*. Seoul:Komunsa. 1997:85,1166-70,1672.
 35. Rich RR. *Clinical immunology*. New York: Mosby. 2001; 4:13,6:18.
 36. Tada T. *Semantics of immunology*. Seoul:Hanul. 2007:103.
 37. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *The National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15620-5.
 38. Charbonnier LM, van Duivenvoorde LM, Apparailly F, Cantos C, Han WG, Noël D, Duperray C, Huizinga TW, Toes RE, Jorgensen C, Louis-Pence P. Immature dendritic cell suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cell. *J Immunol*. 2006;177(6):3806-13.
 39. Rosenwasser LJ, Busse WW, Lizambri RG, Olejnik TA, Totoritis MC. Allergic asthma and an anti-CD23 mAb(IDEA-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(3):563-70.
 40. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4+/CD25+ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3(1):33-41.
 41. Mosby international Ltd. *Crash Course. Immune blood and Lymphatic Systems*. Seoul:Hanwoori. 2000:17-21.
 42. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 1993;36(2): 137-146.
 43. Park SY, Kang DY. Effects of CD11c antibody on induction of localized Shwartzman reaction a with lipopolysaccharide. *Chungnam medical journal*. 2000;27(2):169-182.
 44. Kim SY. *Rheumatoid treatment*. Seoul:Koonja publishing company. 2001:219.
 45. Guo C, Piacentini L. Type I Collagen-induced MMP-2 Activation Coincides with Up-regulation of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase and TIMP-2 in Cardiac Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):46699-708.