

관절7호방이 Type II collagen으로 유발된 흰쥐의 관절염에 미치는 영향

민부기, 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Suppressive Effect of GJB-7 on Collagen-Induced Arthritis in Mice

Boo-Ki Min, Min-Seok Oh

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

Objectives: This study was carried out to know the effects of Gwan-Jul-Bang-7 (hereafter referred to GJB-7) on the inhibition of arthritis induced by collagen on the mouse.

Methods: To assess the effects of GJB-7 on mouse with arthritis induced by collagen II, we conducted several experiments such as analysis of cytotoxicity, hepatotoxicity, arthritis index, total cell number of draining lymph nodes and paw joints, value of immunocyte in PBMC (peripheral blood mononuclear cell), DLN (draining lymph node) and paw joint, measurement of cytokine and anti-collagen II, observation of the histological changes of joint.

Results:

1. Cytotoxicity against HFC (human fibroblast cells) was not observed in any concentration and hepatotoxicity was not observed in the GJB-7 treated group.
2. The incidence of arthritis significantly decreased.
3. Total cell number of draining lymph nodes significantly increased and total cell number of paw joints significantly decreased.
4. The percentage of CD8⁺ cells in PBMC (peripheral blood mononuclear cell) significantly increased. The percentage of CD3⁺/CD69⁺, and CD3⁺/CD49b⁺ cells in PBMC significantly decreased.
5. The percentage of CD19⁺, CD3⁺, and CD4⁺/CD25⁺ cells in DLN (draining lymph nodes) significantly increased. The percentage of B220⁺/CD23⁺ cells in DLN significantly decreased.
6. The percentage of CD3⁺, CD4⁺, and CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in paw joints significantly decreased.
7. The production of TNF- α , IL-6, and MCP-1 significantly decreased.
8. Anti-collagen II in serum significantly decreased.
9. With the hematoxylin and eosin stain, inflammation of joint decreased. Under Masson's trichrome stain, the cartilage destruction and synovial cell proliferation and the expression of collagen fibers decreased.

Conclusions: Comparison of the results for this study showed that GJB-7 had immunomodulatory effects. So we expect that GJB-7 could be used as an effective drug for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune diseases.

Key Words : Gwan-Jul-Bang-7 (GJB-7), rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, immune cells.

서론

류마티오이드 관절염은 대표적인 자가면역성 질환으로 활액막의 염증 및 증식으로 인한 관절의 부종과 동통이 대표적인 증상으로, 진행하면 관절 연골, 뼈, 관절 주위 조직의 파괴로 관절의 강직이나 변형이 나타난다¹⁾. 전 세계인구의 1~2%에서 이환되고 여성이 남성보다 약 2~4배 많이 호발된다²⁾.

류마티오이드 관절염의 직접적인 원인은 아직 규명되지 않고 있으나 류마티오이드 관절염의 활막내에는 T 세포, 섬유아세포양 활막세포, 대식세포, 수지상세포, B 세포, 비만 세포, 파골 세포 등이 침윤되어 있으며 이들 세포간의 상호작용에 의해 관절염이 진행되는 것으로 알려져 있다³⁾.

한의학적으로 류마티오이드 관절염은 痺證의 범주에 속한다고 볼 수 있는데, 이 중 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風과 같은 병증과 매우 유사하며, 발병원인으로는 風, 寒, 濕 外邪의 침입과 肝腎虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다. 치료에 있어서는 虛實에 따라서 淸熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血 하거나 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝한다⁴⁾.

최근 한의학계에서는 류마티오이드 관절염에 대한 연구방법으로 adjuvant, type II collagen으로 유발된 관절염 동물 모델에 한약⁵⁻⁹⁾을 활용하여 면역학적인 측면으로 접근하고 있다¹⁰⁾.

관절7호방은 임상적으로 류마티오이드 관절염을 치료하기 위하여 行血및 舒筋活絡하는 鷄血藤, 祛風濕하는 豨薟草, 燥濕健脾하는 蒼朮, 補脾燥濕하는 白朮, 祛風除濕하는 獨活, 祛風濕 利關節하는 羌活¹¹⁾ 외 17종의 한약재로 구성된 저자의 創案方이다.

이에 저자는 류마티오이드 관절염에 대한 관절7호방의 효과를 실험적으로 규명하고자, type II collagen으로 유발된 류마티오이드 관절염 흰쥐 모델을 이용해서 관절염 발병률과 관절염 지표, 면역세포에 미치는 영향, cytokine 생성량, collagen II 항체량 및 조직학적 변화 등을 측정한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재 료

1) 동물

실험동물은 플라스인터내셔널 (England)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J 흰쥐 24마리를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0 ± 2 °C, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 식이는 고품사료(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 관절7호방(이하 GJB-7로 표기함)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, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, trypan blue, ethyl ether, collagenase, diethyl pyrocarbonate (DEPC), tris Base, RPMI1640, trypsin-0.2% EDTA, chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을, CII 항체 kit는 Scientific Pierce사 (U.S.A.) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A.) 제품을, DMEM은 Gibco사 (U.S.A.) 제품을, 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-CD23는 BD-Pharm-ingen사 (U.S.A.) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅 Co., Korea), microwave oven (LG Co., Korea), flow cytometer (Becton Dickinson Co., U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), centrifuge (한일 Co., Korea), 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), Boichemistry

analyser (Hitachi 7080 co., Japan) 및 homogenizer (OMNI Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

GJB-7 2첩 분량에 각각 증류수 1,500 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치 (rotary vacuum evaporator)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (freeze dryer)를 이용하여 완전 건조하여 48 g을 얻은 후, -80 °C에서 냉동 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Gwanjulbang-7* (GJB-7)

Herb Name	Pharmacognostic nomenclatures	Amount(g)
鷄血藤	<i>Spatholobi caulis</i>	8
豨薟草	<i>Siegesbeckiae herba</i>	8
蒼朮	<i>Atractylodis rhizoma</i>	7.5
白朮	<i>Atractylodis rhizoma white</i>	7.5
羌活	<i>Notopterygii rhizoma</i>	5.6
獨活	<i>Angelicae pubescentis radix</i>	5.6
香附子	<i>Cyperii rhizoma</i>	3.75
半夏	<i>Pinelliae rhizoma</i>	3.75
陳皮	<i>Citri pericarpium</i>	3.75
防己	<i>Stephaniae tetrandrae radix</i>	3.75
升麻	<i>Cimicifugae rhizoma</i>	3.75
澤瀉	<i>Alismatis rhizoma</i>	3.75
茯苓	<i>Poria</i>	3.75
當歸	<i>Angelicae gigantis radix</i>	3.75
川芎	<i>Cnidii rhizoma</i>	3.75
生地黄	<i>Rehmanniae radix</i>	3.75
熟地黄	<i>Rehmanniae radix preparat</i>	3.75
人參	<i>Ginseng radix</i>	3.75
威靈仙	<i>Clematidis radix</i>	3.75
烏藥	<i>Linderae radix</i>	3.75
黃芩	<i>Scutellariae radix</i>	2.6
梔子	<i>Gardeniae fructus</i>	2.6
柴胡	<i>Bupleuri radix</i>	2.6
Total amount		102.5

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 hFCs (human fibroblast cells)로 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37 °C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GJB-7 (최종 농도 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하여 1 시간 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 µl를 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 shaker에서 3.5 speed로 5 분간 흔들어 준 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 기능 측정

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

3) Collagen 유발 관절염(이하 CIA) 생쥐 모델

Collagen 유발 관절염(이하 CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg를 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 정상군, CIA를 유발시킨 대조군, GJB-7 약물 투여한 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다.

4) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 8 마리를 한 군으로 하여 정상군, 치료제를 처리하지 않은 대조군, GJB-7 (16 mg/day)을 투여한 실험군으로 나누어 booster 한 후, 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 실험군은 16 mg/day 농도로 4주 동안 매일 오전 11시에 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 유발율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도를 1주일마다 검사하였다(Table 2).

6) Draining lymph node (이하 DLN), paw joint 의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에

Table 2. Arthritis Index(AI)

SCORE	manifestation
Degree 0	No arthritis
Degree 1	Small degree of arthritis
Degree 2	Light swelling
Degree 3	Medium swelling
Degree 4	Severe swelling

서 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 배양기(180 rpm, 20 min.)에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

7) 형광 유세포 분석

총 세포수 측정에서 나타난 바와 같이, 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, PE-anti-CD19, FITC-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, PE-anti-CD23, 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 PBMC (peripheral blood mononuclear cell), DLN, paw joint에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

8) 혈청 내 cytokine 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 Elisa 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-conjugated 를 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 포맷한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 Collagen deposition 염색인 Masson's-Trichrome 염색을 수행하였다.

CIA 생쥐 모델에 4주간 GJB-7를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyper-plasia에 침투 정도를 분석하였고, collagen deposition 염색인 Masson's-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다.

11) 통계처리

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

성적

1. 세포독성에 미치는 영향

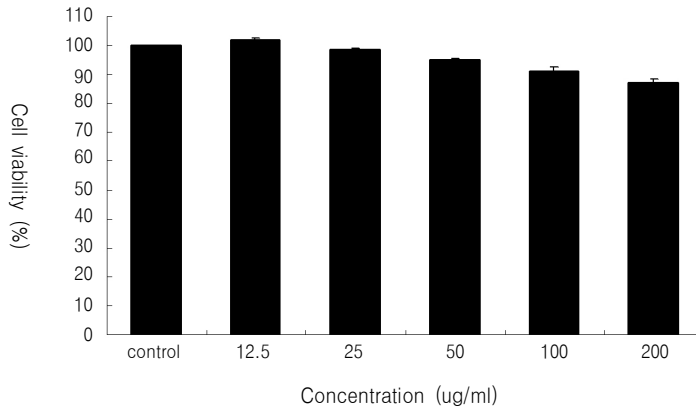


Fig. 1. Cytotoxicity of GJB-7 on human fibroblast cells (hFCs).

Human fibroblast Cells (hFCs) were treated with various concentration (12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of the GJB-7 extract.

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100 ± 0.0 (%)로 나타난 반면, GJB-7의 12.5, 25, 50, 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 투여군에서는 각각 101.90 ± 0.64 , 98.60 ± 0.46 , 95.03 ± 0.40 , 91.27 ± 1.16 , 87.13 ± 1.12 (%)로 나타났다(Fig. 1).

2. 간 기능에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT는 정상군이 36.1 ± 2.4 (U/L), 대조군이 42.1 ± 2.9 (U/L), 실험군에서는 41.9 ± 2.4 (U/L)로 나타났다. AST는, 정

상군, 대조군, 실험군에서 각각 100.3 ± 1.6 (U/L), 114.5 ± 6.4 (U/L), 119.5 ± 1.3 (U/L)로 나타나 유의성이 없었다(Fig. 2).

3. 관절염 유발율에 미치는 영향

관절염 유발율을 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여부터 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였고, 4주째에 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 3).

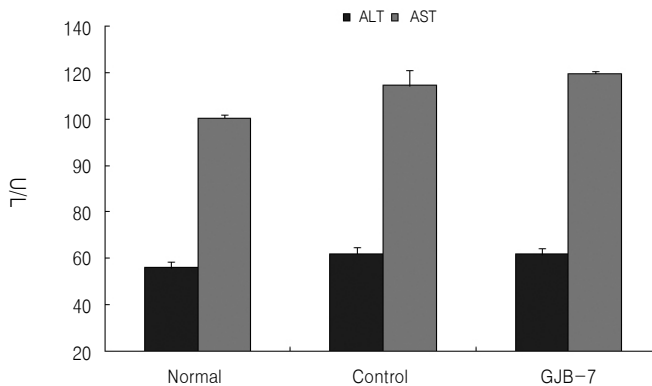


Fig. 2. Effect of GJB-7 on the ALT and AST in CIA mice.

Normal: Normal DBA/1J mouse group, Control: DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection, GJB-7 : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and $16\text{mg}/\text{day}/0.2\text{ml}$ oral treated.

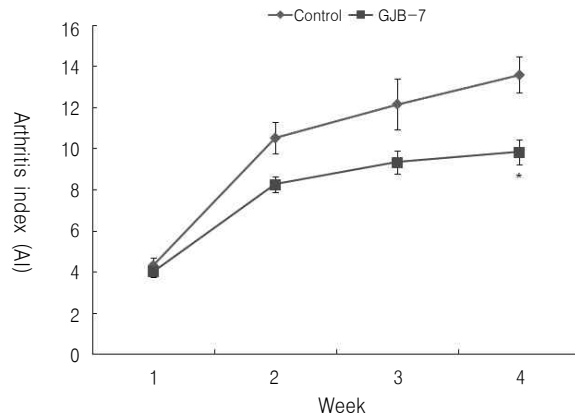


Fig. 3. Suppressive effect of GJB-7 on arthritis index of paw joint in CIA mice

Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every seven day. Following boosterization of collagen mice were divided into two groups. Control: DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection, GJB-7 : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and 16mg/day/0.2ml oral treated. Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05).

4. 총 세포수에 미치는 영향

1) DLN 총세포수

DBA/1J mice에 4주간 GJB-7을 경구 투여한 후 DLN에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, 정상군이 $7.33 \pm 1.0 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$, 대조군이 $2.80 \pm 0.30 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$, 실험군이 $4.56 \pm 0.68 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$ 로 나타나, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 증가를 나타내었다(Table 4).

2) Paw joint 총세포수

DBA/1J mice에 4주간 GJB-7을 경구 투여한 후 Paw joint에서는 정상군이 $3.57 \pm 0.9 (\times 10^6)$, 대조군이 $19.23 \pm 1.65 (\times 10^6)$, 실험군이 $13.07 \pm 2.41 (\times 10^6)$ 로 나타나, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 4).

Table 3. Arthritis Index(AI)

	1주	2주	3주	4주
Control	4.3 ± 0.4	10.6 ± 0.8	12.2 ± 1.2	13.63 ± 0.9
GJB-7	4.0 ± 0.3	8.3 ± 0.4	9.35 ± 0.6	9.85 ± 0.6*

Table 4. Effect of GJB-7 on Total Cell Number of DLN and Paw Joint in CIA Mice

	DLN ($\times 10^6 \text{ cells/mg}$)	Paw joint ($\times 10^6 \text{ cells/mg}$)
Normal	7.33 ± 1.0	3.57 ± 0.9
Control	2.80 ± 0.30*	19.23 ± 1.65†
GJB-7	4.56 ± 0.68‡	13.07 ± 2.41

DLN : Draining lymph node

CIA : Collagen induction arthritis

Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.01, †p<0.001).

Statistically significant value compared with control by T test (‡p<0.05).

5. PBMC 내 면역세포에 미치는 영향

1) CD3⁺/CD69⁺ 세포 발현

PBMC에서 CD3⁺/CD69⁺ 세포수를 백분율(%)로 산출한 결과, 정상군이 1.0 ± 0.1 (%), 대조군이 3.4 ± 1.2 (%), 실험군이 1.0 ± 0.7 (%)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 5).

2) CD8⁺ 세포 발현

PBMC에서 CD8⁺ 세포수를 백분율(%)로 산출한 결과, 정상군이 6.8 ± 0.3 (%), 대조군이 3.8 ± 0.4 (%), 실험군이 5.3 ± 0.3 (%)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 증가를 나타내었다(Table 5).

3) CD3⁺/CD49b⁺ 세포 발현

PBMC에서 CD3⁺/CD49b⁺ 세포수를 백분율(%)로 산출한 결과, 정상군이 2.9 ± 0.6 (%), 대조군이 6.2 ± 0.4 (%), 실험군이 4.6 ± 0.6 (%)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소 효과

를 나타내었다(Table 5).

6. DLN 내 면역세포에 미치는 영향

1) CD19⁺ 세포 발현

DLN에서 CD19⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 29.0 ± 0.6 (×10⁴), 대조군이 11.8 ± 1.1 (×10⁴), 실험군이 17.8 ± 0.7 (×10⁴)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 (**p<0.01) 증가를 나타내었다(Table 6).

2) CD3⁺ 세포 발현

DLN에서 CD3⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 50.3 ± 1.8 (×10⁴), 대조군이 21.7 ± 3.7 (×10⁴), 실험군이 33.1 ± 0.4 (×10⁴)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 증가를 나타내었다(Table 6).

3) CD4⁺/CD25⁺ 세포 발현

DLN에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 5.9 ±

Table 5. Effects of GJB-7 on Percentage of Immunocyte in PBMC of CIA Mice

	CD3 ⁺ /CD69 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD3 ⁺ /CD49b ⁺ (%)
Normal	1.0 ± 0.1	6.8 ± 0.3	2.9 ± 0.6
Control	3.4 ± 1.2 [†]	3.8 ± 0.4 [*]	6.2 ± 0.4 [*]
GJB-7	1.0 ± 0.7 ^{**}	5.3 ± 0.3 [‡]	4.6 ± 0.6 ^{**}

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

CIA : Collagen induction arthritis

Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.01, †p<0.05).

Statistically significant value compared with control by T test (‡p<0.01, **p<0.05).

Table 6. Effects of GJB-7 on Absolute Number of Immunocyte in DLN of CIA Mice

	CD19 ⁺ (×10 ⁴)	CD3 ⁺ (×10 ⁴)	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ (×10 ⁴)	B220 ⁺ /CD23 ⁺ (×10 ⁴)
Normal	29.0 ± 0.6	50.3 ± 1.8	5.9 ± 0.1	14.3 ± 1.4
Control	11.8 ± 1.1 [*]	21.7 ± 3.7 [†]	2.1 ± 0.3 [*]	35.6 ± 3.6 [†]
GJB-7	17.8 ± 0.7 [‡]	33.1 ± 0.4 ^{**}	4.0 ± 0.1 [‡]	23.5 ± 2.3 ^{**}

DLN : Draining lymph node

CIA : Collagen induction arthritis

Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.001, †p<0.01).

Statistically significant value compared with control by T test (‡p<0.01, **p<0.05).

0.1 ($\times 10^4$), 대조군이 2.1 ± 0.3 ($\times 10^4$), 실험군이 4.0 ± 0.1 ($\times 10^4$)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 증가를 나타내었다(Table 6).

4) B220⁺/CD23⁺ 세포 발현

DLN에서 B220⁺/CD23⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 14.3 ± 1.4 ($\times 10^4$), 대조군이 35.6 ± 3.6 ($\times 10^4$), 실험군이 23.5 ± 2.3 ($\times 10^4$)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 증가를 나타내었다(Table 6).

7. Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

1) CD3⁺ 세포 발현

Paw joint에서 CD3⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 0.9 ± 0.1 ($\times 10^5$), 대조군이 17.6 ± 2.3 ($\times 10^5$), 실험군이 6.6 ± 1.4 ($\times 10^5$)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Table 7).

2) CD4⁺ 세포 발현

Paw joint에서 CD4⁺ 세포수를 절대세포수(absolute

number)로 산출한 결과, 정상군이 0.3 ± 0.0 ($\times 10^5$), 대조군이 7.9 ± 0.2 ($\times 10^5$), 실험군이 3.4 ± 0.7 ($\times 10^5$)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Table 7).

3) CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 발현

Paw joint에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포수를 절대세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 0.6 ± 0.1 ($\times 10^5$), 대조군이 60.3 ± 4.0 ($\times 10^5$), 실험군이 46.3 ± 5.2 ($\times 10^5$)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 7).

8. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) TNF- α 생성량

TNF- α 생성량은 정상군이 3.02 ± 0.63 (pg/ml), 대조군이 6.9 ± 0.97 (pg/ml), 실험군이 5.59 ± 0.71 (pg/ml)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 8).

2) IL-6 생성량

IL-6 생성량은 정상군이 3.2 ± 0.7 (pg/ml), 대조

Table 7. Effects of GJB-7 on Absolute Number of Immunocyte in Paw Joint of CIA Mice

	CD3 ⁺ ($\times 10^5$ cells/ml)	CD4 ⁺ ($\times 10$ cells/ml ⁵)	CD11b ⁺ /Gr-1 ⁺ ($\times 10^5$ cells/ml)
Normal	0.9 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1
Control	17.6 \pm 2.3*	7.9 \pm 0.2*	60.3 \pm 4.0*
GJB-7	6.6 \pm 1.4†	3.4 \pm 0.7†	46.3 \pm 5.2‡

CIA : Collagen induction arthritis
 Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.001).
 Statistically significant value compared with control by T test (†p<0.01, ‡p<0.05).

Table 8. Effects of GJB-7 on Levels of Cytokine in the Serum of CIA Mice

	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
Normal	3.02 \pm 0.63	3.2 \pm 0.7	17.5 \pm 3.0
Control	6.9 \pm 0.97*	158.9 \pm 34.3*	46.4 \pm 8.8*
GJB-7	5.59 \pm 0.71†	99.5 \pm 8.8†	29.0 \pm 5.3†

CIA : Collagen induction arthritis
 Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.01).
 Statistically significant value compared with control by T test (†p<0.05).

Table 9. Effects of GJB-7 on Levels of Collagen II Specific Antibody in the Serum of CIA Mice

	Collagen II specific antibody (U/ml)
Normal	0.9 ± 0.0
Control	38.6 ± 3.2*
GJB-7	31.9 ± 2.9†

CIA : Collagen induction arthritis
Statistically significant value compared with normal by T test (*p<0.001).
Statistically significant value compared with control by T test (†p<0.05).

군이 158.9 ± 34.3 (pg/ml), 실험군이 99.5 ± 8.8 (pg/ml)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 8).

3) MCP-1 생성량

MCP-1 생성량은 정상군이 17.5 ± 3.0 (pg/ml), 대조군이 46.4 ± 8.8 (pg/ml), 실험군이 29.0 ± 5.3 (pg/ml)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있

는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 8).

9. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 0.9 ± 0.0 (U/ml), 대조군이 38.6 ± 3.2 (U/ml), 실험군이 31.9 ± 2.9 (U/ml)로 나타나 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 9).



Fig. 4-1. 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. Normal : Normal DBA/1J mouse group, Control : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection, GJB-7 : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and 16mg/day/0.2ml oral treated were analysis with histo-pathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications: × 200.

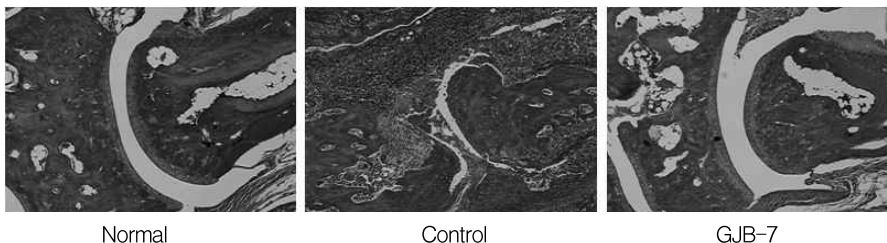


Fig. 4-2. Histological section of paw joints from CIA mice.

DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Masson's Trichrome staining. Normal : Normal DBA/1J mouse group, Control : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection, GJB-7 : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and 16mg/day/0.2ml oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications: × 200.

10. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

실험군에서 대조군에 비하여 윤활관절강에서의 염증을 관찰할 수 없어, 염증이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4-1).

2) collagen deposition 염색인

Masson's-Trichrome 염색

실험군에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막 세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4-2).

고 찰

류마토이드 관절염은 교원성 질환(connective tissue disease)의 일종으로 주로 다발성으로 발생하며¹⁾, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절 연골과 그 주위 조직을 파괴하여 초기에는 관절의 부종과 동통을 초래하나, 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발되고 전신적으로 쇠약해진다¹²⁾.

류마토이드 관절염의 유병율은 전세계적으로 다양하지만, 유럽에서는 0.8%, 중국에서는 0.2~0.93%, 국내는 2003년에 두 지역의 983명을 대상으로 1.4%의 유병율이 보고된 바 있으며, 전 인구의 약 1~2%정도가 이환되어 있을 것으로 추정된다¹³⁾.

류마토이드 관절염의 조직학적 소견은 미세혈관의 손상과 조직의 부종, 활막 세포의 증식과 혈관 주위의 림프구 침윤 등이다. 염증성 사이토카인과 대식세포, CD4⁺ T 림프구 등이 류마토이드 관절염의 면역 염증 질환 유발과 관절의 파괴에 있어서 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 침윤된 활액 조직내의 세포들은 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 등을 분비하며, 고착분자와 단백질 분해효소의 유전자 발현 등의 생성량을 증가시킨다¹⁶⁾. 이들 사이토카인의 국소적인 생산물이 류마토이드 관절염의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 생각되며, 이러한 요소들이 다른 염증세포의

유인과 활성화 및 연골과 골의 쇠퇴에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾.

류마토이드 관절염의 서양 의학적 치료는 보존적 치료, 약물치료, 수술적 치료로 나눌 수 있는데 보존적 치료는 적절한 영양공급과 안정, 휴식, 유발요인에 대한 처치, 물리치료 등을 실시하며, 약물치료는 부신피질호르몬, 아스피린과 비스테로이드성 항염증제, 항류마토이드제제 등을 사용한다. 이상의 치료에도 불구하고 관절의 통증, 관절의 종창, 구축, 신경증세가 출현하거나 진행되면 외과적 수술을 시행하고 있으나¹⁸⁾, 골수부전, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많다¹⁹⁾ 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 류마토이드 관절염은 痺證의 범주에 속한다고 볼 수 있으며⁴⁾, 《黃帝內經·素問》²⁰⁾ 痺論에서 痺證은 風寒濕에 의하여 발생한다고 하였으며 行痺, 痛痺, 着痺, 肝心脾肺腎의 五臟痺, 筋脈肌皮骨의 五痺에 대해 언급하고 있다. 漢代 張仲景은 《傷寒論》²¹⁾ 太陽病脈證并治篇과 《金匱要略》²²⁾ 痙濕暈病脈證并治篇, 中風歷節病脈證并治篇에서 太陽風濕, 濕痺, 歷節病을 언급하며 그 증상으로 “歷節痛不可屈伸”, “其痛如掣”, “諸肢節疼痛 身體魁 脚腫如脫” 하다고 기술하고 증상에 따라 처방을 달리 하였다. 隋代 巢元方은 《諸病源候論》²³⁾에서 痺證을 風濕痺, 風痺, 風不仁, 風冷, 風四肢拘攣不得屈伸 등의 증후로 나누어 파악하였다.

痺證은 正氣不足이 발병의 내재적 소인이고 風, 寒, 濕, 熱의 感受가 外因이 된다²⁴⁾. 痺證은 風, 寒, 濕, 熱의 邪氣가 인체에 침범하여 經絡이 阻滯되고 氣血運行이 不暢하여 발생하며 肌肉, 筋骨, 關節에 痠痛, 麻木, 重着, 屈伸不利를 야기하거나, 심하면 關節腫大灼熱 등을 나타낸다^{25,26)}.

Steffen과 Timple에 의해 collagen에 대한 면역학적 특이 반응이 류마토이드 관절염의 유발과 악화에 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제기된 이후²⁷⁾, 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되었고^{28,29)}, Trentham 등에 의해 흰쥐에서

type II collagen 접종으로 인한 관절염 모델이 확립된 이래, collagen 유발 관절염 모델은 임상적, 조직학적 및 면역학적으로 인간의 류마토이드 관절염 모델로 주로 사용되고 있다³⁰⁾.

최근 한의학계에서 행해진 type II collagen 유발 관절염에 대한 실험적 연구를 살펴보면 한약 실험에서는 神仙氣步湯³¹⁾, 疏經活血湯加味³²⁾, 鷄血藤複合方³³⁾이 류마토이드 관절염에 유효함을 보고하였다.

관절7호방은 鷄血藤, 豨薟草 각 8 g, 蒼朮, 白朮 각 7.5 g, 羌活, 獨活 각 5.6 g, 香附子, 半夏, 陳皮, 防己, 升麻, 澤瀉, 茯苓, 當歸, 川芎, 生地黃, 熟地黃, 人蔘, 威靈仙, 烏藥 각 3.75g, 黃芩, 梔子, 柴胡 각 2.6g 으로 구성되었는데, 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하는 효능이 있으며¹⁵⁾ 류마토이드 관절염 환자의 활막세포와 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 효과가 있음이 보고 되었다^{33,34)}. 豨薟草는 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒하는 효능이 있는데¹⁵⁾ 염증성 cytokine 및 류마토이드 관절염에 효과가 있다³⁵⁾. 蒼朮은 燥濕健脾 治脚氣痿躄, 白朮은 補脾燥濕, 獨活은 祛風除濕, 羌活은 祛風濕 利關節, 香附子是 理氣解鬱止痛, 半夏는 燥濕化痰, 陳皮는 理氣燥濕化痰, 防己는 祛風除濕 行氣止痛, 升麻는 清熱解毒, 澤瀉는 利水滲濕, 茯苓은 利水滲濕, 當歸는 補血和血, 川芎은 活血行氣 祛風止痛, 生地黃은 清熱涼血, 熟地黃은 滋陰補血, 人蔘은 大補元氣, 威靈仙은 祛風除濕 通絡止痛, 烏藥은 順氣止痛, 黃芩은 瀉實火 除濕熱, 梔子는 清熱瀉火涼血, 柴胡는 和解退熱하는 효능이 있다¹⁵⁾.

이처럼 관절7호방은 祛風濕, 清熱, 理氣止痛, 補血補氣 등의 효과가 있는 처방들로 구성되어 류마토이드 관절염의 치료에 유효할 것으로 생각하여 창안한 처방이다.

이에, 저자는 관절7호방이 류마토이드 관절염에 미치는 치료 효과를 규명하고자, type II collagen으로 유발된 류마토이드 관절염 동물모델을 이용해서 세포독성에 미치는 영향, 간기능에 미치는 영향, 관절염 유발에 미치는 영향, 면역세포에 미치는 영향, cytokine 생성량에 미치는 영향, collagen 항체

량, 조직학적 변화를 연구하여 류마토이드 관절염의 억제와 면역조절에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

관절7호방(이하 GJB-7라 함)의 안정성을 알아보기 위하여 세포독성 및 간 기능에 미치는 영향(혈청 ALT, AST)을 측정하였다.

본 실험에서 hFCs에 대한 세포독성이 없는 것으로 나타났고, 간 기능에도 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1,2).

GJB-7이 관절염 유발에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매주 1회 검사한 결과, 4주째에 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

이 결과로 실험군이 대조군에 비해 유의한 관절염 유발 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

이러한 관절염 유발 억제 효과가 전신적인 면역 반응 및 관절염 병소의 면역 반응과 어떠한 관련이 있는지 알아보기 위하여 면역세포들의 집합 장소이며 통로인 림프절과 관절염의 주요 발병처인 관절내 면역세포의 변화를 관찰하였다.

먼저 DLN(drainig lymph node) 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군 $7.33 \pm 1.0 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$ 에 비하여 대조군은 $2.80 \pm 0.30 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$ 로 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 대조군에 비하여 실험군에서는 $4.56 \pm 0.68 (\times 10^6 \text{ cells/mg})$ 로 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 4).

Paw joint에서는 정상군 $3.57 \pm 0.9 (\times 10^6)$ 에 비하여 대조군은 $19.23 \pm 1.65 (\times 10^6)$ 로 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 대조군에 비하여 실험군에서는 $13.07 \pm 2.41 (\times 10^6)$ 로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 4).

이는 대조군에 비해 실험군이 림프절에서의 면역세포수를 증가시키며, 관절염 병소의 면역세포수는 감소시킨다는 것을 나타낸다고 볼 수 있다.

면역세포의 하나인 림프구는 기능에 따라 B 림프구, T 림프구, 자연 살해 세포의 세 가지 집단으로 나뉜다. B 림프구는 항체를 생산하기 때문에 체액성 면역반응에서 중요한 기능을 나타내며, T 림프구는

세포내 미생물성 항원을 인식하며 이들 미생물 또는 감염된 세포를 파괴하는 세포성 면역의 기능을 갖는다. 자연살해세포는 자연면역반응에서 암세포나 바이러스에 감염된 세포를 죽이는 기능을 하는 세포이다³⁶⁾.

림프구들은 서로 모양이 비슷하여 어느 것이 B 림프구인지 T 림프구인지 현미경으로는 구분할 수 없으며, 특징적인 세포표면 단백질인 CD (cluster of differentiation) 분자를 통해 구분할 수 있다³⁶⁾.

PBMC (peripheral blood mononuclear cell)에서 CD3⁺/CD69⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, CD8⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, CD3⁺/CD49b⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 5).

위의 결과는 PBMC에서 실험군이 대조군에 비해 정상군에 가까워지려는 경향을 보여 B 림프구, T 림프구의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다.

DLN에서 CD19⁺ 세포 발현을 측정된 결과 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, CD3⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, CD4⁺/CD25⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, B220⁺/CD23⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 6).

위의 결과는 DLN에서 실험군이 대조군에 비해 정상군에 가까워지려는 경향을 보여 B 림프구, T 림프구의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다.

Paw joint에서 CD3⁺ 세포 발현을 측정된 결과 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, CD4⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 발현은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 7).

위의 결과는 paw joint에서 실험군이 대조군에 비해 급격하게 면역세포수가 감소하여 정상군에 가까워지려는 경향을 보여 T 림프구의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다.

사이토카인(cytokine)은 한 세포에서 생산되어 다른 세포의 형태에 영향을 미치는 단백질로 림프구에서 생산되는 사이토카인을 림포카인(lymphokine) 또는 인터루킨(interleukin, IL)이라고 한다. 사이토카인은 표적세포의 특이 수용체와 결합한다³⁷⁾.

TNF- α 는 활성화된 대식세포, 섬유아세포 등에 의해 분비되는 사이토카인으로 염증반응을 매개하는데 호중구, 내피세포 및 B 림프구 등을 자극하여 chemokines, prostaglandins, proteases 및 growth factors 등을 분비하게 한다³⁸⁾.

IL-6는 림프계세포와 골수성 림프계세포에서 생성되며 감염이나 손상 등에 의한 급성 반응을 보이며 면역에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여한다³⁹⁾.

Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)은 Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 대식세포, monocyte, mast cell, neutrophil, astrocyte, fibroblast 등의 많은 세포에서 분비되는 사이토카인으로 세포성 면역반응이나 세포 성장, 분화 등에 관련되어 있다. 또한 MCP-1은 면역체계에서 세균의 감염 시 염증반응을 매개하여 이를 제거하는 역할을 하며 혈관내피세포를 자극하여 주위의 세포들을 자연사시키는 역할을 하기도 한다^{40,41)}.

GJB-7이 CIA 모델에서 사이토카인 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청을 분석하였다.

본 실험에서 TNF- α 생성량을 측정된 결과 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IL-6 생성량은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, MCP-1 생성량은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 8).

위의 결과는 실험군이 대조군에 비해 사이토카인 생성증가를 억제하여 유의한 면역활성이 있음을 알 수 있었다.

관절염 발생초기에는 B 림프구가 관계하는 체액성 면역반응이 보다 중요한 역할을 하는데, B 림프구의 표면에서 방출되는 IgG anti-collagen 항체는 제II형 collagen에 대한 특이반응을 보인다. 이 항체가 증가하는 경우 관절염이 발생하며, 일반적으로 항체정도와 관절염의 심한 정도는 관련이 있어 이를

측정하여 관절염의 개관적 지표로 이용하고 있다⁴²⁾.

본 실험에서 Collagen II 항체량은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 9).

Hematoxylin and eosin 염색은 조직의 구조를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 윤활관절강에서의 염증을 관찰할 수 없어 상대적으로 감소하였다(Fig. 4-1).

Masson's Trichrome stain은 collagen fiber를 관찰하기 위한 染色으로, 조직학적으로 실험군에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막 세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4-2).

이상의 실험결과를 종합하면 관절7호방은 type II collagen으로 유발된 흰쥐의 관절염 유발율을 유의하게 억제하였으며 면역세포 발현을 관찰한 결과 DLN에서 총 면역세포수의 유의성 있는 증가가 나타났고, paw joint에서 총 면역세포수의 유의성 있는 감소가 나타났다. 이는 대조군에 비해 실험군이 림프절에서의 면역세포수를 증가시키며, 관절염 병소의 면역세포수는 감소시킨다는 것을 나타낸다. PBMC, DLN, paw joint에서 B 림프구, T 림프구의 활성화에 영향을 주었고, cytokine 생성량과 collagen II 항체량을 유의하게 감소시켰으며, 조직학적 염증 소견을 감소시켰다.

이 같은 결과는 관절7호방이 류마토이드 관절염의 치료에 유효할 것으로 사료된다. 따라서 향후 보충실험 및 임상에서의 효과에 대한 연구가 따라야 할 것이다.

결론

관절7호방이 type II collagen으로 유발된 흰쥐의 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여, 관절염 유발율과 관절염 지표, 면역세포에 미치는 영향, 사이토카인 생성량, collagen II 항체량 및 조직학적 변화 등을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성 및 간독성은 나타나지 않았다.
2. 관절염 유발율은 유의성 있게 감소하였다.
3. DLN에서의 총 세포수는 유의성 있게 증가하였고, paw joint에서의 총 세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
4. PBMC 내 CD8⁺ 세포는 유의성 있게 증가하였으며, CD3⁺/CD69⁺, CD3⁺/CD49b⁺ 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
5. DLN 내 CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺/CD25⁺ 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, B220⁺/CD23⁺ 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
6. Paw joint내 CD3⁺, CD4⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포는 유의성 있게 감소하였다.
7. 혈청 내 TNF- α , IL-6, MCP-1 생성량은 유의성 있게 감소하였다.
8. Collagen II 항체량은 유의성 있게 감소하였다.
9. Paw joint내 Hematoxylin & Eosin 염색에서 윤활관절강에서의 염증을 관찰할 수 없어 상대적으로 감소하였고, Masson's-Trichrome 염색에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

이상의 결과로 관절7호방은 type II collagen으로 유발된 관절염을 억제하는 것으로 나타났으며 이는 임상적으로 류마토이드 관절염 치료에 유효할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한 정형외과학회. 정형외과학. 서울:최신의학사. 2001:123-31, 175-89.
2. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울:정담출판사. 2006:78-99.
3. Chin N. Tran, Steven K. Lundy, David A. Fox. Synovial biology and T cell in rheumatoid arthritis. Pathophysiology. 2005;12(3):183-9.

4. 김기현. 痺證. 서울:정담출판사. 1993:23-9.
5. Hwang DS. Effects of Kagammokbanggi-tang on the Adjuvant-induced arthritis in rats. Semyung university graduate school. 2005.
6. Kim MK, Oh MS. Inhibitory effects of Gamidaeganghwang-tang(Jiaweidaqinghuo-tang) on rheumatoid arthritis induced by type II Collagen. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine*. 2009;19(2):89-102.
7. Choi JY, Heo DS, Yoon IJ, Oh MS. Study on the Effect of Gwanjulbang-5 in Rheumatoid Arthritis. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 2007;21(3):728-35.
8. Han JS, Song YI, Yoon IJ, Oh MS. Inhibitory Effect of Kuseupbokhap-bang(Qùhū fùéfāng) on Rheumatoid Arthritis in Human Fibroblast-like Synoviocytes. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine*. 2006;16(3):1-16.
9. Hong SS, Yoon IJ, Oh MS. Study on the Effect of Geopungjeseup-tang in Rheumatoid Arthritis. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 2006;20(5):1241-4.
10. Choi DY, Lee JD, Back YH, Lee SS, Yoo MC, Han JS. Recent Trends of Immunologic Studies of Herbal Medicine on Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2004;21(4):177-96.
11. 전국 한의과 대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 1995:128, 149, 151, 167, 178, 190, 260, 261, 263, 276, 289, 302, 305, 347, 354, 355, 409, 445, 448, 531, 536, 578, 580.
12. James B Wyngaeden. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia. WA Saunders company. 1992:1508-15.
13. 이준희, 김성일. 류마티스 관절염의 역학과 진단. *Hanyang medical Reviews*. 2005;25(2):4-12.
14. Brahn. E, Peacock DJ, Banquerigo ML, Liu DY. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) on collagen arthritis. *Lymphokine Cytokine Res*. 1992;11:253.
15. Dolhain, R.J., van der Heiden, A.N., ter Haar. N.T., Breedveld, F.C., Miltenburg, A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1996;39:1961-9.
16. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis : what have we learned? *Annu Rev Immunol*. 2001;19:163-96.
17. Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K. Amelioration of collagen- induced arthritis by blocade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J of Immunol*. 2002;169:4332-9.
18. 김동휘 외. 최신진단과 치료. 서울:약업신문사. 1992:634-7.
19. Bae SC. Novel treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Korean Academy of Family Medicine*. 2001;22(1):21-6.
20. 王琦 外. 黃帝內經素問今釋. Seoul:成輔社. 1983: 206.
21. 蔡仁植. 傷寒論譯註. Seoul:高文社. 1984:9-141.
22. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北:大聯國風出版社. 1950: 30-9.
23. 巢元方. 諸病源候論. 北京. 人民衛生出版社. 1983: 51.
24. 中國中等醫學教材編纂委員會. 中醫內科學. 保健新聞社. 1995:682-4.
25. 張伯輿. 中醫內科學. 人民衛生出版社. 1988:627.
26. 金賢濟 外. 韓醫學辭典. Seoul:成輔社. 1983:302, 478.
27. Steffen C, Timple R. Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis area. *Int Arch allergy*. 1963;22:333-49.
28. Cheung HS. Identification of collagen subtypes in synovial fluid sediments from arthritic patients. *Am J Med*. 1980;68:73-9.
29. Choi EKK. Autoantibodies to type II collagen occurrence in rheumatoid arthritis. autoimmune

- connective tissue disease and inflammatory syndromes. *Ann Rheum Dis*. 1988;47:313-22.
30. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977;146(3): 857-68.
31. Koo BK. Inhibitory Effect of SSKBT on Interleukin-6(IL-6) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Induced Inflammatory Cytokine Production in Murine Synovial Cells. Deajeon university graduate school. 2005.
32. Lee JH. Immunity effect of the Sogyughwahlyeltangami in collagen-induced arthritis(CIA) mice. Deajeon university graduate school. 2005.
33. Lim JS. (The) Experimental Study of Gyeheold-eung-bokhapbang on the Collagen-Induced Arthritis. Semyung university graduate school. 2006.
34. 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.
35. Cho YJ. Effects of *Siegesbeckia herba* on pro-inflammatory cytokines and rheumatoid arthritis. Deajeon university graduate school. 2003.
36. 세포분자면역학 교재연구회 역. 세포분자면역학 (6판). 서울:이퍼블릭. 2008:11-3, 31-4, 145, 147, 148, 150, 172, 173, 441, 510, 531-6.
37. Peter Parham. 면역학 제2판. Seoul:Lifescience. 2006:454.
38. Kim YH. A study on the biological actions and funtions of cytokines. *Journal of Jeonju Kijeon University*. 2000;20:271-85.
39. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor a paradigm for cytokines. *Science*. Oct1992;258(5082):593-7.
40. Conti P, Boucher W, Letourneau R, Feliciani C, Reale M, Barbacane RC. Monocyte chemotactic protein-1 provokes mast cell aggregation and [3 H] 5HT release. *Immunology*. 1995;86(3): 434-40.
41. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA (May 1992). Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med*. 1992;175(5):1271-5.
42. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH.. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med*. 1998;76(3-4): 275-88.