

# 백출(白朮)의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 관절염 개선 효과 연구

김송희<sup>1</sup>, 박용기<sup>1,2\*</sup>

1 : 동국대학교 한방신약개발센터, 2 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

## Effects of *Atractylodis Rhizoma Alba* extract on collagen-induced arthritis in mice

Song Hee Kim<sup>1</sup>, Yong-Ki Park<sup>1,2\*</sup>

1 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

2 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 740-814, Republic of Korea.

### ABSTRACT

**Objectives** : The present study was undertaken to evaluate whether *Atractylodis Rhizoma Alba* ethanol (ARA-E) extract, which is the pericarp of *Atractylodes japonica* Koidz., has an effect on collagen-induced arthritis (CIA) in mice.

**Methods** : Male DBA/1J mice were induced by intradermal injection of bovine collagen-II in Freund's incomplete adjuvant (IFA). The CIA mice in the onset of arthritis were treated daily with oral administration of ARA-E extract at dose of 50 mg/kg/bw for 28 days. Arthritis index, histopathological changes and the levels of anti-type II collagen (CII) IgG and inflammatory cytokine, TNF- $\alpha$  in sera of mice were measured to evaluate the antiarthritic effect of ARA-E.

**Results** : ARA-E extract significantly decreased the arthritic scores and inhibited pathological changes of knee joint tissues in CIA mice. ARA-E extract also significantly decreased the serum levels of anti-CII IgG and TNF- $\alpha$  in CIA mice. These results indicate that ARA-E extract may effectively prevent arthritic damages in CIA mice, at least partially, by inhibiting the production of autoantibodies and inflammatory cytokine.

**Conclusions** : This studies suggest that ARA-E has a therapeutic potential in inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis.

**Key words** : *Atractylodis Rhizoma Alba*, *Atractylodes japonica*, anti-arthritic effect, collagen-induced arthriiis

## 서 론

염증은 물리적, 화학적 및 감염성 자극에 의해 신체 기본적인 보호 작용의 이상반응과 과도할 경우 혈관의 혈류 및 혈관 투과성의 변화로 정상조직에 손상을 일으킨다<sup>1)</sup>. 류마티스 관절염은 대표적인 만성 염증성 관절염으로 골관절염 다음으로 흔히 발병되는 관절 질환이며 자가면역질환이다<sup>2)</sup>. 류마티스 관절염 환자는 전 세계적으로 약 1% 정도이며, 국내에서는 약 50만명 이상으로 모든 연령대에서 발병할 수 있으며, 특히 30대에서 50대 사이에서 흔히 볼 수 있는 질환이다<sup>3,4)</sup>. 류마티스 관절염의 발병 원인은 아직 정확히 이해되고 있지 않으나 관절활막을 침범하는 만성 자가면역질환으로 생명에는 지장이 없으나 비가역적 관절 손상, 만성 통증, 강직, 관절의

기능 손상 등을 동반함으로써 환자의 환자 삶의 질을 현저히 저하시키는 질환이다. 현재 류마티스 관절염을 완치시키거나 예방할 수 있는 방법은 없고 주로 조기 진단을 통해 초기 적절한 치료를 하도록 하고 있으며, 관절의 비가역적 손상과 활막 염증으로 인한 관절의 변형과 파괴를 막아주는 약물치료를 사용하고 있다. 즉 발병 초기 염증 억제를 위한 비스테로이드성 소염진통제 또는 methotrexate, sulfasalazine 등과 같은 항류마티스제제를 투여하고 있으며, 증상 및 질병 활성도가 조절되지 않는 경우 TNF- $\alpha$  길항제, IL-6 수용체 길항제 등의 생물학적 제제를 함께 사용하고 있다<sup>5-7)</sup>. 그러나 최근 병인에 대한 분자생물학적 이해가 깊어지면서 류마티스 관절염 치료를 위한 면역학적 접근방법들이 다양하게 시도되고 있으며, 특히 한약재 효능 및 기전에 대한 연구들이 활발

\*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2012년 4월 16일 · 수정 : 2012년 4월 25일 · 채택 : 2012년 4월 25일

하게 이루어지면서 한방처방약물로부터 우수한 천연물 신약 개발이 주목받고 있다<sup>8,9)</sup>.

한의학에서 관절염은 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺, 風痺 痺症 등으로 관련있으며, 痺證의 범주의 해당된다<sup>10)</sup>. 痺란 기혈운행이 不通하거나 근육관절의 濡養이 失調되었을 때, 風寒濕熱의 邪氣에 感受하여 발생하며 肢體, 關節의 疼痛, 痠痛, 麻木, 重着, 活動障礙等を 主要症狀으로하는 病證이다<sup>11)</sup>.

백출(白朮, *Atractylodes Rhizoma Alba*)은 국화과(Compositae)에 속한 多年生 本草인 삼주(*Atractylodes japonica* Koidz.) 및 당백출(*A. macrocephala* Koidz.)의 根莖으로, 霜降부터 立冬 사이에 채취하여 莖葉과 泥土를 제거하고 曬乾한 후 다시 鬚根을 제거한 것이다<sup>12)</sup>. 백출에 대하여 東醫寶鑑<sup>13)</sup>에는 “성질이 따뜻하고 맛이 쓰고 달고 독이 없으며, 비위를 든든하게 하고 설사를 멎게 하고 습을 없애고, 소화를 시키고, 땀을 거두며 명치 밑이 몹시 그득한 것과 곱관으로 토하고 설사하는 것이 멎지 않는 것을 치료하며, 허리와 배꼽사이의 혈을 잘 돌게 하며 위가 허약하여 생긴 냉리를 치료한다” 고 되어 있다. 또한 백출의 효능에 대한 실험연구를 통해 파골세포 분화 조절효과<sup>14)</sup>, 항산화효과<sup>15)</sup>, 황금·산조인·백출 추출물의 생리활성에 따른 암세포 증식억제효과<sup>16)</sup>, 당뇨병 흰쥐에서의 췌장 및 신장 보호효과<sup>17)</sup> 등이 보고되었다. 그러나 백출의 염증성 관절염의 예방 및 개선에 대한 효과는 보고된 바 없다.

이에 저자는 백출의 염증성 관절염에 대한 효능을 평가하기 위해 에탄올추출물을 제조하여 콜라겐 유도 관절염(collagen-induced arthritis; CIA) 마우스에서의 관절염 개선 효과를 조사하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 백출(*Atractylodes japonica* Koidz., *Atractylodes Rhizoma Alba*; ARA)은 백출의 뿌리줄기를 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선한 후 사용하였다.

#### 2) 동물

실험동물은 7주령의 DBA/1J계 수컷 마우스(mouse, 20±2 g)를 (주)오리엔트바이오(경기도, 한국)으로부터 구입하였고 고형사료와 물을 제한 없이 공급하면서 일정한 온도(25±5°C)와 습도(50±10%) 및 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하여 사육하였다.

#### 3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약은 bovine type II collagen(Chondrex, Redmond, WA, USA), complete Freund's adjuvant(Sigma-Aldrich, St Louse, CA, USA), incomplete Freund's adjuvant(Sigma-Aldrich), mouse anti-type II collagen IgG assay kit(Chondrex), mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit(BD

Biosciences, San Jose, CA, USA), hematoxylin & eosin (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 등을 사용하였다.

실험에 사용되어진 기기로는 rotary evaporator(Eyela, Tokyo, Japan), freeze dryer(Ilshin, Gyeonggi-do, Korea), microplate reader(Asys, Sunnyvale, CA, USA), microscopy(Olympus Imaging America Inc., Center Valley, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 약물 제조

백출 200 g에 70% 에탄올 1 L와 함께 12시간 동안 2회 추출하여 와트만여과지(Wathman No. 1)로 여과한 후 감압·농축하였다. 이를 동결건조하여 백출의 에탄올추출물을 제조하였으며, 이때 수득율은 24%였다. 백출의 에탄올추출물(ARA-E)은 냉장 보관하면서 실험 직전 멸균된 생리식염수에 완전히 용해한 후 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과하여 실험약물로 사용하였다.

### 2) 염증성 관절염 마우스모델 제작

콜라겐-유도 염증성 관절염(collagen-induced arthritis, CIA) 동물모델을 제작하기 위해서 먼저 0.05 M acetic acid 에 제2형 콜라겐(bovine type II collagen) 2 mg/ml이 녹여진 콜라겐 용액과 동량(w/v)의 Freund's complete adjuvant (Chondrex, SA, USA)와 잘 혼합한 후 0.1 ml을 마우스의 꼬리에 피하주사 하였다. 이를 다시 14일 후 동일 방법으로 제조된 콜라겐 용액에 Freund's incomplete adjuvant를 동량으로 혼합하여 마우스의 꼬리가 몸체로 이어지는 둔부에 피하 주사함으로써 염증성 관절염의 발병을 유발하였다(Fig. 1).

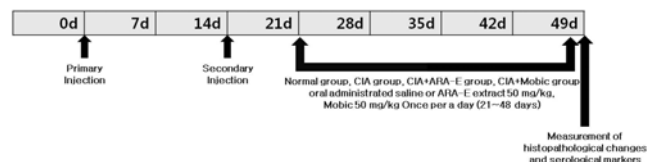


Fig. 1. Experimental scheme on collagen-induced arthritis in mouse

모든 실험군은 한 군 당 10마리의 마우스를 사용하였으며, 관절염을 유발시키지 않은 정상 대조군, 관절염을 유발시킨 대조군(CIA) 및 백출추출물을 100 mg/kg 용량으로 투여한 약물투여군(CIA+ARA-E) 및 COX-2 억제제인 모빅(mobic)을 50 mg/kg 용량으로 투여한 약물 대조군(CIA+Mobic)으로 나누었다. 또한 백출추출물 및 모빅의 투여는 관절염 유발 후 21일부터 48일까지 매일 1회 정해진 시간에 경구 투여하였으며, 49일째 모든 실험동물을 이소플라빈 마취 후 심장천자에서 혈액을 수집하거나 관절 조직을 적출하였다. 수집된 혈액은 5,000 rpm에서 10분간 2회 원심분리하여 혈청을 분리함으로써 혈액학적 검사를 위해 사용하였다.

### 3) 관절염 중증도 평가

William 등<sup>22)</sup>에 의한 관절염 지수 측정방법(rheumatoid scoring system)을 이용하여 실험동물의 관절염 정도(clinical severity)를 21일부터 48일까지 5일 간격으로 관찰

하였다. 즉 관절염증증도의 평가는 실험군과 대조군에 대해 알고 있지 않은 두 명 이상의 관찰자가 참여함으로써 관찰자에 따른 오차를 최소화하였으며, 부종이나 발적, 종창 등 관절염의 증거가 없는 경우를 0점, 한 두 개의 발가락 종창을 동반한 홍조를 띄거나 최소한의 종창이 유발된 상태로 족근골이나 발목 관절에 국한된 경한 부종과 발적이 있는 경우를 1점, 확실한 홍조를 띄거나 국부적 상지 종창, 그리고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태, 발목 관절에서 족근골에 걸친 증증도의 부종과 발적이 있는 경우를 2점, 그리고 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 발목에서 발가락 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우를 3점으로 하여 네 발의 측정값의 평균값을 계산하였다.

#### 4) 혈액학적 검사

##### (1) 항콜라겐 항체의 농도

혈청 내 항콜라겐 항체의 농도는 면역효소반응법(ELISA)으로 측정하였다. 즉 콜라겐 항체(anti-type II collagen monoclonal antibody)가 도포된 96-well microplate의 각 well에 표준 농도의 콜라겐 용액 또는 희석용액으로 희석된 (1:1000) 혈청을 넣은 후 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이를 세척용액(wash buffer)으로 3회 세척한 다음 각 well에 horseradish peroxidase(HRP)가 감작된 2차 항체(peroxidase-conjugated mouse IgG)를 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 반응의 종료를 위해 2N sulfuric acid를 넣은 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 콜라겐 용액의 측정값을 기준으로 표준농도곡선을 작성하여 각 시료의 흡광도를 대입함으로써 혈청 내 농도를 계산하였다.

##### (2) TNF- $\alpha$ 농도 측정

혈청 내 염증사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 양은 ELISA 방법으로 측정하였다. 즉 mouse TNF- $\alpha$  단클론 항체가 코팅된 96-well microplate의 각 well에 TNF- $\alpha$  표준액 또는 마우스의 혈청을 넣은 후 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 세척용액으로 5회 세척한 다음 HRP-conjugated anti-mouse TNF- $\alpha$  용액을 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 세척용액으로 5회 세척한 다음 기질반응액(substrate chromogen solution)을 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 여기에 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 넣어 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TNF- $\alpha$ 의 농도는 TNF- $\alpha$  표준액의 측정값을 기준으로 표준농도곡선을 작성하여 각 시료의 흡광도를 대입함으로써 혈청 내 농도를 계산하였다.

#### 5) 조직표본 제작 및 염색

실험 49일째 모든 실험동물들을 희생시킨 후 우측 족근 관절이 포함되도록 경골 원위부에서 중족골(metatarsal) 원위부(distal) 사이를 적출하고 4% 중성 포르말린용액(formaldehyde)에 4°C에서 24시간 고정한 후 10% EDTA가 포함된 fermic acid에 7~14일간 침지하여 탈회하였다. 탈회된 조직을 24시간 수세하여 조직 내 남아있는 포르말린을 제거한 후, 50% 알코올에서부터 무수알코올까지 농도 상승순으로 탈수하고 자일렌(xylene)으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포

매하여 파라핀 블록을 제작하였으며 회전형 박질기(microtome)를 사용하여 5  $\mu$ m두께로 자른 뒤 슬라이드 위에 놓아 조직표본을 제작하였다. 제작한 파라핀 조직표본은 xylene, 무수알코올, 50% 알코올 순으로 탈 파라핀 과정을 거친 후 Hematoxylin & eosin(H&E) 염색시약으로 염색하여 광학현미경 하에 관절조직의 형태변화를 관찰하였다.

#### 6) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램의 one-way ANOVA, Tukey's test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 관절염 발병도 변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 염증성 관절염이 유발된 마우스에서 나타나는 관절염의 발병도(clinical severity)에 대한 백출추출물의 효과를 확인하기 위해 콜라겐 주입 후 21일부터 48일까지 5일 간격으로 관절염 지수(arthritis score)를 측정하였다.

그 결과, 콜라겐 유도 관절염(CIA) 대조군에서는 관절염의 지수가 시간에 의존적으로 증가하였으며, 백출추출물을 50 mg/kg 투여한 약물군(ARA-E)은 관절염 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2). 또한 양성 대조약물인 모빅(mobic) 50 mg/kg 투여군에서도 CIA 대조군에 비해 유의적으로 관절염 지수가 감소되었으며, 백출추출물 투여군과 유사한 것으로 나타났다.

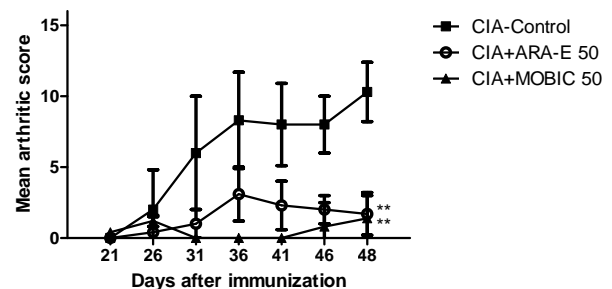


Fig. 2. Effect of Atractylodis Rhizoma Alba extract on arthritic scores in collagen-induced arthritic mice. Mice were orally administrated with Atractylodis Rhizoma Alba extract(ARA-E) at dose of 50 mg/kg or Mobic 50 mg/kg once daily from 21 to 48 days after first immunization. Results are expressed mean  $\pm$  SD (n=10). \*\*p<0.01 vs. CIA control.

### 2. 항-콜라겐 항체 생성에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 염증성 관절염이 유발된 마우스에서 생성되는 자가항체인 콜라겐 항원 특이 항체인 항-콜라겐 항체(anti-type II collagen mAb) 분비에 대한 백출추출물의 효과를 조사하기 위해서 혈청 내 존재하는 항-콜라겐 항체(anti-CII IgG)의 농도를 면역효소반응법으로 측정하였다.

그 결과, 정상대조군은 1.48  $\pm$  0.26 units/ml, CIA 대조군은 24.21  $\pm$  3.47 units/ml, 백출추출물 투여군(ARA-E)은 21.25  $\pm$  2.40 units/ml로 측정되어 백출추출물 투여에 의해

관절염에 의한 항-콜라겐 항체의 증가가 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 한편 양성대조약물인 모빅 투여군에서도 항-콜라겐 항체의 농도가  $20.04 \pm 4.00$  units/ml로 CIA 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 이는 백출추출물 투여군과 유사한 것으로 나타났다.

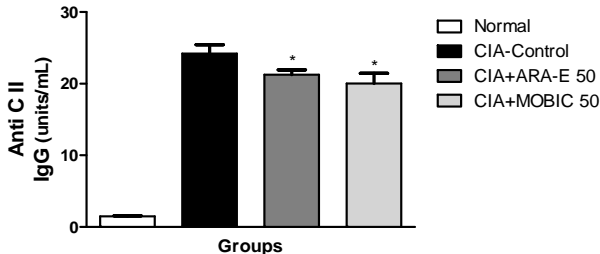


Fig. 3. Effect of Atractylodis Rhizoma Alba extract on serum levels of anti-type II collagen IgG in collagen-induced arthritic mice. Mice were orally administrated with Atractylodis Rhizoma Alba extract(ARA-E) at dose of 50 mg/kg or Mobic 50 mg/kg once daily from 21 to 48 days after first immunization. The serum levels of anti-CII IgG were measured by ELISA. Results are expressed mean  $\pm$  SD (n=10). \* $p$ (0.05 vs. CIA control).

### 3. TNF- $\alpha$ 생성에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 염증성 관절염이 유발된 마우스에서 생성되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  분비에 대한 백출추출물의 효과를 조사하기 위해서 혈청 내 존재하는 TNF- $\alpha$ 의 농도를 면역효소반응법으로 측정하였다.

그 결과, 정상대조군은  $47.90 \pm 5.03$  ng/ml, CIA 대조군은  $78.67 \pm 8.10$  ng/ml, 백출추출물 투여군(ARA-E)은  $69.67 \pm 4.67$  ng/ml로 측정되어 백출추출물 투여에 의해 관절염 유발에 따른 TNF- $\alpha$ 의 농도 증가가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 한편 모빅 투여군에서는 TNF- $\alpha$ 의 농도가  $70.33 \pm 2.83$  ng/ml로 CIA 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 백출추출물 투여군과 유사한 것으로 나타났다.

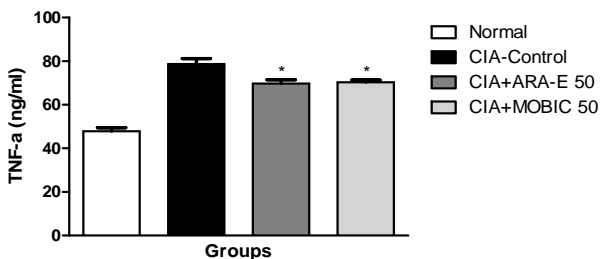


Fig. 4. Effect of Atractylodis Rhizoma Alba extract on serum levels of TNF- $\alpha$  in collagen-induced arthritic mice. Mice were orally administrated with Atractylodis Rhizoma Alba extract(ARA-E) at dose of 50 mg/kg or Mobic 50 mg/kg once daily from 21 to 48 days after first immunization. The serum levels of TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. \* $p$ (0.05 vs. CIA group) ( $n=10$ ).

### 4. 관절조직의 형태변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 염증성 관절염이 유발된 마우스에서 나타나는 족근관절의 손상에 대한 백출추출물의 효과를 조사하기 위해서 관절조직을 H&E 염색하였다.

그 결과, 관절염이 유발된 대조군(CIA)의 족근 관절에서는

관절 주위의 부종, 다형 백혈구 및 림프구 등 염증세포들의 침윤과 더불어 관절활막의 염증, 비후 및 현저한 관절면의 연골손실을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 그러나 백출추출물을 투여한 마우스에서는 CIA 대조군에 비해서 관절 내 염증세포 침윤과 활막의 비후가 감소되었고, 관절면의 연골 손실이 줄어들어서 염증성 관절염에 따른 관절의 골 파괴가 억제되는 것으로 나타났다.

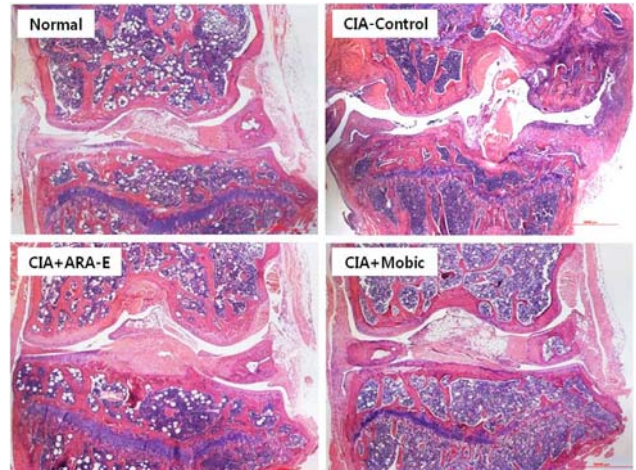


Fig. 5. Effects of Atractylodis Rhizoma Alba ethanol extract on histological changes of ankle joints in collagen-induced arthritic mice. Mice were orally administrated with Atractylodis Rhizoma Alba extract(ARA-E) at dose of 50 mg/kg or Mobic 50 mg/kg once daily from 21 to 48 days after first immunization. Histological changes were observed by H&E staining( $\times 100$ ).

## 고찰

류마티스 관절염은 환경적인 요인과 유전적 소인의 작용에 따른 면역조절 기전에 이상으로 발생하는 자가면역질환의 일종으로 주로 관절 활막에 만성적인 비대 및 염증반응을 유발함으로써 연골과 골 파괴로 인한 관절 파괴와 변형을 특징으로 하는 만성 염증질환이다<sup>1,2</sup>. 류마티스 관절염 환자는 우리나라 인구의 1~2%이며 주로 40, 50대 여성에게 발병되며 연령에 따라 발병율이 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>3,4,18</sup>.

한의학에서 류마티스 관절염은 痺證의 범주의 해당되며, 문헌적으로 <황제내경>과 張仲景의 <傷寒論> 및 <金匱要略>에 언급되어 있으며, 그 중 <黃帝內經>에 따르면 “痺症의 의미는 閉寒不通이 기본이며, 廣義로는 臟腑, 器官, 組織의 氣機가 적체되어 발생하는 증상이고, 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 운행을 방해하고 經路의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 매우 고통스러운 症狀을 의미한다” 고 되어 있다<sup>10,11,19</sup>.

백출(白朮)은 補氣藥으로 健脾益氣, 燥濕利水, 止汗安胎 하는 작용이 있다고 보고되어 있으며 최근 실험연구를 통해 파골세포 분화유도<sup>14</sup>, 항산화 활성<sup>15,16</sup> 및 당뇨 개선효과<sup>17</sup> 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 백출의 에탄올추출물을 제조하여 콜라겐으로 유도된 염증성 관절염 마우스에서의 개선 효과를 확인하였다. 동물모델로 사용된 콜라겐 주입에 의한 염증성 관절염 유발 마우스(DBA/1J) 모델은 체내 제2형 콜라겐(type II collagen)을 주입함으로써 항-콜라겐 항체 생성을 통해 자가면역성이 유도되는 류마티스 관절염 동물모델

로 H-2q나 H-2r형의 HMC class II 물질을 갖는 특정 마우스 계통에 제2형 콜라겐과 adjuvant를 섞어 주사함으로써 관절염을 유도하게 되며 이 과정에서 제2형 콜라겐에 특이적으로 반응하는 CD4+ T 세포와 B 세포가 발생하며 이러한 적응 면역반응세포가 여러 가지 병적 단계를 유발하는 다른 세포 또는 물질들을 동원함으로써 자가면역반응을 활성화하는 중추적인 역할을 하게 된다. 본 관절염 동물모델은 조직학적으로 사람의 류마티스 관절염과 매우 유사하여 류마티스 관절염 병리를 설명하기에 가장 적합한 모델로 관절염 연구에 널리 이용되고 있다<sup>20,21)</sup>. 류마티스 관절염의 원인으로 자가면역설이 현재 가장 일반적이며 실제 류마티스 관절염 환자의 혈액이나 병변관절에서 rheumatoid factor라고 하는 환자 자신의 IgG Fcfragment에 대한 자가 항체가 생성되며 이는 병변부위로 많은 B 세포와 형질세포의 침윤과 부분적인 섬유소성 괴사 등이 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 즉, 제2형 콜라겐(type II collagen) 항원을 주입하면 마우스에서 병리적 역할을 하는 자가항체인 항-콜라겐 항체가 다량 생성되어 관절 연골의 주요 구성요소인 콜라겐을 지속적으로 공격함으로써 결국 관절을 파괴하게 된다<sup>23)</sup>. 본 연구에서 백출 에탄올 추출물의 투여는 관절염이 유발된 마우스의 혈청 내 항-콜라겐 항체의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 백출추출물이 류마티스 관절염 발달 시 자가항체 생산 반응을 조절함으로써 질환의 진행을 막을 수 있음을 의미한다.

한편, T 세포나 B 세포와 같은 후천적 면역세포들은 항원에 반응할 때 여러 가지 활성 물질을 생성하게 되는데 이 중 사이토카인은 세포성 면역반응, 항체생성 조절, 암세포 증식과 파괴, 염증 및 알레르기 반응 등에 관여한다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1은 류마티스 관절염 환자의 활막액에서 고농도로 측정되며 관절 내 염증반응과 뼈와 연골을 손상시키며 활막세포를 증식시키는 중요한 역할을 하는 사이토카인이다<sup>24)</sup>. 특히 TNF- $\alpha$ 는 활막의 섬유아세포와 연골세포에서 교원섬유 분해효소나 단백분해효소의 분비를 촉진시키며, 관절연골 표면의 프로테오글리칸(proteoglycan) 형성을 억제하고, 교원섬유의 분해를 일으켜서 관절연골을 파괴함으로써 염증성 관절염 병인기전에 중요한 역할을 한다<sup>25,26)</sup>. 본 연구에서 백출의 에탄올추출물 투여는 관절염 마우스에서 혈청 내 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의적으로 감소시켰으며 이는 백출추출물이 관절염에서 염증반응을 유발하는 중요 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킴으로써 관절활막 내 염증 발생과 진행을 막을 수 있음을 의미한다.

류마티스 관절염은 활막 내 염증 유발 뿐 아니라 골 파괴를 특징으로 하는 관절 질환으로 병이 진행됨에 따라 염증이 더욱 심해져서 연부조직의 종창, 관절 주위 골밀도 감소, 관절강 협착, 골미란(erosion), 관절경화(ankylosis) 등의 증상을 나타내게 되므로 중요한 치료 목표 중 하나가 염증을 억제하고 골을 보호함으로써 관절의 기능을 유지하게 하는 것이다<sup>27-29)</sup>. 본 연구에서 콜라겐 주입으로 관절염이 유발된 마우스는 시간이 지날수록 관절염 증중도가 심해졌으며 이에 따라 죽근 관절의 부종 형성과 활막 염증, 비후, 염증조직으로의 염증세포 침윤 및 관절면 손상이 관찰되었으며, 백출의 에탄올추출물의 투여는 이러한 관절염의 조직학적 변화를 억제함으로써 관절염 증상을 개선시키는 것으로 나타났다. 이는 백출 추출물이 관절조직 내 염증반응과 골 파괴를 억제함으로써

관절염을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

결론적으로 본 연구에서 백출의 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 관절염 증중도를 억제하고, 자가항체인 항-콜라겐 항체와 염증사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의적으로 감소시키며, 관절조직의 변형과 골 파괴를 억제함으로써 염증성 관절염을 개선시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 백출이 관절 질환의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있음을 의미한다.

## 결론

본 연구에서는 백출 에탄올추출물의 콜라겐 유도 관절염 마우스에서의 관절염 개선 효과를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백출추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 관절염 증중도를 유의적으로 감소시켰다.
2. 백출추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스의 혈청 내 항-콜라겐 항체와 TNF- $\alpha$ 의 증가를 유의적으로 감소시켰다.
3. 백출추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스의 죽근 관절의 형태적 변형을 막고 관절활막의 비후와 연골면의 파괴를 억제하였다.

따라서 백출의 에탄올추출물은 콜라겐 유도 관절염 마우스에서 관절염 개선 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 백출이 사람의 염증성 관절염 개선에 도움을 될 수 있음을 의미한다.

## 참고문헌

1. Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi MM. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res*, 2005 ; 51 : 95-105.
2. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. In : Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, eds. *Harrison's principles of internal medicine*, 16th ed. New York : Mc Graw Hill, 2005 : 1968-77.
3. Lee JS. Updated on rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*, 2009 ; 76(3) : 296-9.
4. Song YW. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*, 2009 ; 76(1) : 1-6.
5. The Korean Orthopaedic Association. *orthopedics*, 5th ed. seoul : cholsin medicine publisher, 2000 : 109-31, 157-74, 176.
6. The Korean Society of Pathologists. *Pathology*, seoul : komoonsa, 1997 : 85, 1166-70, 1672.
7. The whole country a college of Oriental medicine rehabilitation medical science classroom. *Oriental medicine rehabilitation medical science*, seoul : seowondang, 1995 : 95-6.
8. Kim CS, Park YK. The therapeutic effect of *Achyranthis Radix* on the collagen-induced arthritis in mice. *Kor. J. Herbology*, 2010 ; 25(4) : 129-35.

9. Jung JK, Son KH, Kim YS, Park YK. Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice. *Kor. J. Herbology*. 2011 ; 26(3) : 1-6.
10. Shanghai China medicine Book, Internal medicine (the first). Shanghai : Shanghai science technology publisher. 1983 : 234-38.
11. Chung SH. The Study on classification and treatment of Arthralgia Syndrome. The Korean Acedemy of Oriental Rehabilitation Medicine. 1991 ; 2(1) : 56-66.
12. The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation. Herbalogy. seoul : younglimsa. 2007 : 578-80.
13. Huh J. Tonguibogam. seoul : Hyesungsa. 1994.
14. Park ST. Effect of *Atractylodes Rhizoma alba* on Osteoclast formation. Wonkwang University Graduate School. 2010.
15. Choi SH. Pharmacological and Molecular studies of *Atractylodes japonica* Koidzumi on anti-oxidant activity. Kyunghee University Graduate School. 2011.
16. Park CS, Kim DH. Biological Activities of Extracts from *Scutellaria baicalensis*, *Zizyphus jujuba* and *Atractylodes macrocephala*. *Kor. J. Herbology*. 2008 ; 23(3) : 41-51.
17. Han YY, Park YK. Effect of *Atractylodes Rhizoma Alba* water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Kor. J. Herbology*. 2011 ; 26(4) : 23-30.
18. Park SH. New diagnostic method of rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*. 2009 ; 76(1) : 7-11.
19. Lee AR, Byun H, Park IS, Jung CY, Kang MJ, Kim EJ, Lee SD, Kim KS. The effectiveness of *Ulmus Davidiana* Planch herbal acupuncture to inhibit NF- $\kappa$ B activation on type II collagen-induced arthritis in mice. *The J of Kor Acupncture & Moxibustion Society*. 2007 ; 24(6) : 15-27.
20. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977 ; 146 : 857 -68.
21. Myers LK, Brand DD, Ye XJ, Cremer MA, Rosloniec EF, Bodo M, Myllyharju J, Helaakoski T, Nokelainen M, Pihlajaniemi T, Kivirikko K, Yang CL, Ala-Kokko L, Prockop DJ, Notbohm H, Fietzek P, Stuart JM, Kang AH. Characterization of recombinant type II collagen: arthritogenicity and tolerogenicity in DBA/1 mice. *Immunology*. 1998 ; 95 : 631-9.
22. Kim TW, Yang MH. Immunohistology of Rheumatoid Arthritis. *Kyunghye Med*. 1985 ; 1(1) : 29.
23. Lee J. B cells and autoantibody in RA pathogenesis. *Hanyang Medical eviews*. 2005 ; 25(2) : 21-5.
24. Kim KH. Cytokine and Its role. *Journal of Life Science*. 1993 ; 3(3) : 136-42.
25. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990 ; 33(3) : 305-15.
26. Cole P, Rabasseda X. The soluble tumor necrosis factor receptor etanercept : a new strategy for the treatment of autoimmune rheumatic disease. *Drugs Today (Barc)*. 2004 ; 40 : 281-324.
27. Ji JD. Diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *The Journal of the Korean Academy of Family Medicine*. 2006 ; 27 : S326-9.
28. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis : 2002 Update. *Arthritis Rheum*. 2002 ; 46 : 328-46.
29. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 ; 350 : 2591-602.