

# 秦艽가 Collagen誘發 關節炎의 免疫反應에 미치는 影響

김성재 · 이언정 · 김형균 · 송봉근\*

## ABSTRACT

### Effects of *Gentiana macrophylla* on Immune Response in the Collagen induced Arthritis

Seong-Jae Kim, Eon-Jeong Lee, Hyeong-Kyun Kim, Bong-Keun Song  
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, Iksan, Korea

To know the effects of *Gentiana macrophylla*(GM) on the immune response , this study was undertaken.

GM is one of the well-known oriental medicines for a long time used for the treatment of such diseases as arthralgia, headache, hepatitis, SLE, hemiparesis, and so on.

To evaluate the effects of GM on immune response in the collagen induced arthritis, phagocytic activity of macrophages, proliferation of T-lymphocytes, secretion of nitric oxide in urine, and production of ROIs, TNF- $\alpha$  and nitric oxide in synoviocytes were measured.

The results obtained in this study were as follows :

1. During the progress of CIA, the administration of GM enhanced phagocytic activity of macrophages in vivo and vitro.
2. During the progress of CIA, the administration of GM inhibited production of ROIs in synoviocytes.
3. During the progress of CIA, the administration of GM inhibited production of TNF- $\alpha$  in synoviocytes.

---

\* 원광대학교 한의과대학 내과학교실

4. During the progress of CIA, the administration of GM inhibited proliferation of T lymphocytes.

5. During the progress of CIA, the administration of GM inhibited production of nitric oxide in synoviocytes.

6. During the progress of CIA, the administration of GM inhibited secretion of nitric oxide in urine.

According to the above results, during the progress of CIA, it might be considered that GM has a curative effect on rheumatoid arthritis by controlling immune response.

Key words : collagen induced arthritis, immune response.

## 1. 緒 論

秦艽는 龍膽科(Gentianaceae)에 屬한 多年生草 本인 秦艽(*Gentiana macrophylla* Pall.) 와 麻花秦 艽(*G. straminea.*), 粗莖秦艽(*G. crassicaulis* Du- thie ex Burk.) 或은 小秦艽(*G. dahurica* Fisch.) 의 뿌리를 乾燥한 것<sup>1-4)</sup>으로, 『神農本草經』<sup>5)</sup>에 “秦艽味平微溫無毒 主寒熱邪氣 寒濕風痺 肢節痛 下水利小便”이라고 하여 最初로 言及되었으며, 祛風除濕, 和血舒筋, 清熱利尿의 效能<sup>6)</sup>이 있어, 臨床的<sup>7)</sup>으로 痺證, 中風後遺症의 手足不遂, 陰虛 內熱, 骨蒸潮熱, 濕熱黃疸 等에 應用되어 왔다.

最近에 秦艽는 實驗動物 쥐에서 解熱作用을 가 지는 것으로 報告되고 있고<sup>8)</sup>, 鎮靜, 鎮痛, 催眠作用<sup>9-10)</sup> 및 血壓降下作用과 抗히스타민作用이 있으며<sup>11)</sup>, 痢疾菌 等を 包含한 各種 病原菌에 對한 抗菌 作用이 報告되고 있다<sup>12)</sup>. 아울러 秦艽의 成分중 gentianine은 消炎 및 腫脹消退의 作用이 있어 formalin性 蛋白性 關節炎을 抑制하며<sup>2,6,7,11)</sup>, 랫트 의 足關節 浮腫을 減少시키는 것으로 報告되고 있다<sup>13)</sup>. 또한 秦艽는 臨床的으로 關節炎 治療에 有效하다는 報告가 있으며<sup>14-15)</sup>, 抗류마티스藥으로 分類되고 있기도 하다<sup>16-17)</sup>.

류마티스 關節炎은 全身的인 慢性 炎症性 疾患 으로 關節內 滑膜炎이 基本病變이며 關節內 軟骨 과 周圍組織의 炎症反應을 主病變으로 하며, 關

節以外에도 여러 臟器를 侵犯하는 全身疾患이다<sup>18-20)</sup>. 그 原因은 感染, 免疫機能調節障礙, 비타민 缺乏, 호르몬 不調和, 遺傳의 素因 等이 있으나 주 로 自家免疫疾患의 하나로 分類한다<sup>19,21,22-25)</sup>. 그 러나 아직까지 류마티스 關節炎에 對한 治療方法 이 正確히 밝혀지지 않아서 CIA (collagen induced arthritis)가 류마티스 關節炎의 代表的 實驗動物 모델로서 活用되고 있다<sup>26)</sup>.

CIA의 證狀은 갑자기 發生하며 臨床的으로 四 肢의 手足關節과 股關節에 腫脹, 紅斑, 浮腫, 痛症 으로 인한 運動障礙가 나타난다<sup>27)</sup>. 또한 組織學的 으로 是 增殖性 炎症性 關節炎의 特徵을 보여 滑 膜 肥大와 副滑膜 組織에 炎症細胞의 沈着 및 細胞의 關節領域으로의 流出, 境界 領域의 破壞, 骨 膜炎, 軟骨 表面의 斷片化가 일어나며<sup>28-30)</sup>, 免疫 學的으로 多様な 免疫 擔當 細胞들이 活性化 되 어있는 特徵을 보여 류마티스 關節炎과 類似한 症狀이 나타나기 때문에 이 疾患의 發生 機轉을 研究하는 重要한 模型으로 널리 利用되고 있다.

韓醫學에서 류마티스 關節炎은 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎風 等으로 表現되었으며, 크게 痺證 의 範疇에 包含된다<sup>31-35)</sup>. 痺證은 風寒濕熱의 邪氣 에 感觸됨으로써 筋骨, 肌肉, 關節 等에 疼痛, 酸 楚, 麻木, 重着, 關節腫大, 活動障礙 等を 主要症 狀으로 하는 하나의 病症으로<sup>36-38)</sup>, 多様な 治療方 法이 活用되고 있다. 藥物療法으로는 祛風藥物이

많이 사용된다고 하였던 바, 祛風藥物 中에는 秦芫가 多用되고 있다<sup>39)</sup>. 따라서 抗炎 및 鎮痛作用을 가지며 痺證의 治療에 活用되어<sup>9)</sup> 온 秦芫가 류마티스 關節炎의 治療에 應用될 수 있으리라 기대되며 그 效能에 對한 研究가 必要할 것으로 思料된다.

그 동안 韓醫學에서 關節炎에 對한 實驗研究로, 李<sup>40)</sup>는 大羌活湯을, 申<sup>41)</sup>은 桂枝芍藥知母湯을, 嚴<sup>42)</sup>은 骨騰草를 使用하여 第2型 collagen誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響을 보고 하였고, 또한 秦芫가 關節炎에 有效하다는 臨床的 報告가 있으나<sup>14-15)</sup>, 秦芫의 CIA型 關節炎에 對한 研究는 報告된바 없다.

이에 著者는 秦芫가 CIA型 關節炎에 미치는 影響을 糾明하고자, 秦芫를 CIA가 誘發된 마우스에 投與하여 免疫反應을 觀察하여 본바 有意性 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗 材料

#### (1) 動物

160 - 180g 사이의 Sprague Dawley rat(圓光大學校 韓醫科大學 實驗動物飼育實)를 cage(18×20cm)당 6個體의 密度를 維持하였으며, 2週日間 室溫에서 물과 飼料(第一飼料株式會社)를 充分히 供給하고, 낮과 밤의 週期를 12시간씩 調節하면서 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 飼育한 다음 本 實驗에 使用하였다.

#### (2) 藥材 및 抗原

本 實驗에서 使用한 秦芫는 圓光大學校 韓醫科大學 附屬全州韓方病院에서 求入한 後 精選하여 使用하였다. 抗原으로 쓰인 collagen은 Sigma에서 購入하여 이 實驗에 使用하였다.

#### (3) 그 외 試藥

細胞培養에 必要한 모든 試藥은 GIBCO에서 購入하였고 <sup>3</sup>H-thymidine은 Amersham에서, Histopaque는 Sigma에서 購入하였고 그 밖의 모든 試藥은 순도 높은 試藥을 選擇하였다.

### 2. 方法

#### (1) Collagen에 의한 면역

Bovine type II collagen(Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) 을 10mM acetic acid에 2 mg/ml의 濃度로 넣고 4°C에서 12시간 以上 흔들어 주었다. Rat에 注射하기 바로 前에 Complete Freund's Adjuvant(Sigma Chemical Co.)와 섞어 1:1 현탁액으로 만든後 0.1 ml을 rat의 꼬리 基部에 皮內 注射하였다. 1次 注射로부터 3週後 同一한 抗原을 Incomplete Freund's Adjuvant (Sigma Chemical Co.)로 유탁액을 만들어 1次 注射와 同一한 方法으로 注射하였다.

#### (2) 檢液의 調製 및 投與

秦芫 37.39g을 2000ml 등근 플라스크에 넣고 蒸溜水 620ml를 加하여 100°C로 4時間 동안 重湯하여 濾過布로 濾過하였으며, 濾過液을 1000rpm에서 20分間 遠心分離하여 얻은 上清液을 다시 重湯하여 100ml(1x)씩으로 濃縮하여 檢液으로 使用하였다. 豫備實驗에서 이 랫트의 하루 물 攝取量은 28 - 30ml程度였으며 秦芫로 바꾸어 줄 境遇 25 - 26ml程度로 줄어들음을 알 수 있었다. 따라서 各各의 檢液投與群에서는 檢液을 랫트 1마리당 GM1群은 檢液(GM:DW=1:10, 0.1x)을, GM2群은 檢液(GM 1x)을, GM3群은 檢液(GM 10x)을 2次 抗原 注射와 同時에 25ml씩 1日 1回씩 14日 동안 經口投與 하였다. 對照群은 同量의 生理食鹽水(0.85% NaCl)을 同一方法으로 投與하였다.

#### (3) 脾臟細胞 分離와 大食細胞 分離

2次 抗原 注入과 檢液 投與 後 各各 7日과 14日 제의 各 그룹의 랫트로 부터 秘藏을 꺼내어 組織으로 부터 全體 脾臟細胞를 單一細胞形態로 抗生劑(100units/ml, streptomycin 100ug/ml)와 2mM glutamine, 25mM HEPES, 10%의 우태아 血清이 添加된 Dulbico's modified Eagle's medium에 分散시킨 뒤 Histopaque 3ml에 密度 구배원심분리하여 各 脾臟으로 부터 림프구를 얻었다. 얻어진 림프구는 차가운 PBS로 洗滌하여 1 x 10<sup>6</sup> /ml로 다시 分散시킨 後 細胞 生存率을 trypan blue 染色方法으로 確認한 結果 95%以上일 경우의 細胞를 使用하였다.

2次 抗原 注入과 檢液 投與 後 各各 7日과 14日된 各 그룹의 랫트의 上皮를 切開한 後에 腹腔에 滅菌된 HBSS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> -free)5ml를 注射하여 Pasteur pipette으로 腹腔內의 peritoneal exudate cell(PEC)을 얻었다. 얻은 腹腔內 細胞는 滅菌된 HBSS로 2번 洗滌한 後 培養液과 함께 培養접시에 4.5 x 10<sup>6</sup> cells/dish로 깔고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 濕氣가 있는 狀態에서 3시간 동안 培養한 後 1 mM EDTA가 섞인 PBS로 附着되지 않은 細胞를 除去하였다. 附着되어 있는 大食細胞는 피펫으로 여러번 씻어 떼어낸 後 300g, 10분동안 遠心分離한 後 PBS로 2번 洗滌하여 얻었고 95% 以上の 生存率을 確認한 後 細胞를 收穫하여 차가운 PBS로 400g에서 10分間 遠心分離하여 2回 洗滌한 後 大食細胞 活性度 分析에 利用하였다.

(4) 大食細胞의 貪食能 分析(43-52)

a. 大食細胞의 誘導 및 分離

i) 生體內實驗

2次 抗原 免疫後 檢液 投與 各 7日과 14日된 實驗群 생쥐의 上皮를 切開한 後에 腹腔에 滅菌된 HBSS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> -free)5ml를 注射하여 Pasteur pipette으로 腹腔內의 大食細胞를 分離하였다. 分離된 大食細胞는 HBSS로 3回 洗滌한 後 貪食能 分析에 使用하였다.

ii) 生體外 實驗

正常 마우스의 腹腔에 滅菌된 PBS(pH7.2)로 腹腔을 洗滌하여 腹腔大食細胞가 充分한 peritoneal exudate cell(PEC)을 얻었다. GM液을 各各의 濃度로 添加하여 6時間 培養 後에 細胞를 harvest하여 차가운 PBS로 400g에서 10分間 遠心分離하여 2回 洗滌한 後 大食細胞 活性度 分析에 利用하였다.

b. 大食細胞의 貪食能 分析

大食細胞의 貪食能 測定은 FITC가 附着된 polystyrene latex particle (1.88μm, Polysciences, Warrington)을 使用하였다. 5% fetal bovine serum이 添加되어 있는 RPMI 1640 medium에 1x10<sup>6</sup>개의 大食細胞와 5x10<sup>7</sup>개의 fluorescent latex particle 50μl를 添加한 後 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 및 濕氣가 充分한 培養器에 45分間 37°C에서 培養하였다. 培養後 2ml의 cold HBSS를 添加한 後 400g로 10分間 遠心分離하여 2回 反復 洗滌하였다. 綠色螢光을 나타내는 大食細胞의 貪食能은 流式細胞分離分析器로 測定하였다. 488nm 세기로 發光된 argon-ion laser beam 200mw 出力에서 分析되었으며, 綠色螢光物質은 530nm의 band pass filter에서 選擇적으로 透過되어 感知되었다. 感知된 情報는 BDIS Consort 30 Computer Program에 의하여 百分率로 計算되었다. 大食細胞의 貪食能 測定은 다음 公式에 따랐다.

$$\text{Phagocytic Activity(\%)} = \frac{\text{TEO-TE45}}{\text{TEO}} \times 100$$

TEO = FITC로 라벨된 latex particle(5x10<sup>7</sup>)과 大食細胞(1x10<sup>6</sup>)를 0時間 培養 후 latex particle의 數.

TE45 = FITC로 라벨된 latex particle(5x10<sup>7</sup>)과 大食細胞(1x10<sup>6</sup>)를 45分間 培養 후 latex particle의 數.

(5) synovial섬유아세포의 反應酸素中間物質 (ROI : Reactive Oxygen Intermediate) 生成能의 測定(53-55)

i) 生體內 實驗

2次 免疫後 各 濃度의 藥物을 投與하여 各 各 7日과 14日째의 랫트의 synovial 細胞를 위와 같은 方法으로 培養하여 veronal buffered saline ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , albumin, glucose 포함)에  $5 \times 10^6$  cells/300 $\mu$ l가 되도록 適定한 後 chemiluminescence (CL)를 測定하였다.

ii) 生體外 實驗

正常 랫트의 synovial 細胞를 培養하여 GM液을 各 各의 濃度로 添加하여 6時間 培養後에 細胞를 harvest하여 차가운 PBS로 400g에서 10分間 遠心分離하여 2回 洗滌한 後 veronal buffered saline ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , albumin, glucose 포함)에  $5 \times 10^6$  cells/300 $\mu$ l가 되도록 適定한 後 chemiluminescence (CL)를 測定하였다.

① Lucigenin에 의해 誘導된 CL의 測定

Veronal buffered saline을 利用해  $5 \times 10^6$  cells/300 $\mu$ l로 適定된 synoviocytes 浮遊液을 Luminometer (LB 9509, Berthold)內에서 37 $^{\circ}$ C로 15-30分 동안 preincubation시킨 後  $O_2^-$ 를 測定할 수 있는 chemiluminogenic probe인 10mM의 Lucigenin 10 $\mu$ l를 注入하고 安靜化 시킨後 synoviocytes를 刺戟시킬 수 있는 5.3 $\mu$ M phorbol myristate acetate (PMA) 10 $\mu$ l를 注入하고 37 $^{\circ}$ C條件에서 約 60分間 CL를 測定했다.

② Luminol에 의해 誘導된 CL의 測定

Veronal buffered saline을 利用해  $5 \times 10^6$  cells/300ml로 適定된 synoviocytes를 Luminometer (LB 9509, Berthold)內에서 37 $^{\circ}$ C로 15-30分 동안 preincubation시킨 後  $H_2O_2$ 를 測定할 수 있는

chemiluminogenic probe인 10mM의 luminol 10 $\mu$ l를 注入하고 安靜化 시킨後 大食細胞를 刺戟시킬 수 있는 5.3 $\mu$ M phorbol myristate acetate (PMA) 10 $\mu$ l를 注入하고 37 $^{\circ}$ C條件에서 約 60分間 CL를 測定했다.

(6) TNF- $\alpha$  사이토카인의 定量 (ELISA)

正常組織에서 培養한 synoviocytes에 秦芘를 各 各의 濃度에 따라 培養細胞에 添加하고 48時間 동안 培養한 後에 各 well로 부터 100 $\mu$ l씩 培養液을 取하여 目的에 맞게 使用한다.

TNF- $\alpha$ 에 대한 특히 단클론 抗體를 먼저 ELISA plate에 붙인 다음 各 well당 sample을 넣고 約 1-2時間 反應시킨後, 2次 抗體를 添加시킨다. 以後 alkaline-phosphatase가 conjugation된 抗體를 넣은 後 pNPP로 發色反應을 한 다음 約 1時間 後 405 nm filter에서 吸光度를 測定한다. 對照群으로써 2次 免疫 後 韓藥을 投與하지 않은 synoviocytes를 使用하였다.

(7) T립프구 增殖

96 well plate (105 cells per well)에 分離한 립프구를 M. tuberculosis를 最終 濃度 5 $\mu$ g/ml로 넣은 後 7日 동안 37 $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$  存在下에서 培養하였다. 1  $\mu$ Ci의 [ $^3H$ ]-thymidine (47Ci  $nmol^{-1}$ )을 各 well에 넣은 後 4時間 동안 培養한 後 細胞를 收穫하여 [ $^3H$ ]-thymidine의 量을 재서 增殖의 程度를 알아보았다. 各 實驗은 세번의 反復으로 決定하였다.

(8) 무릎關節로부터 synovial 纖維芽細胞의 分離 및 培養

랫트의 무릎關節部位의 synovium을 떼어낸 뒤 synovium을 4-6mg으로 자른 後 평판 접시에 4mg/ml의 collagenase와 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4-5時間 동안 培養한 後 10分 동안 500g로 遠心分離하고 DMEM으로 2번 洗滌하여  $10^6$ 細胞

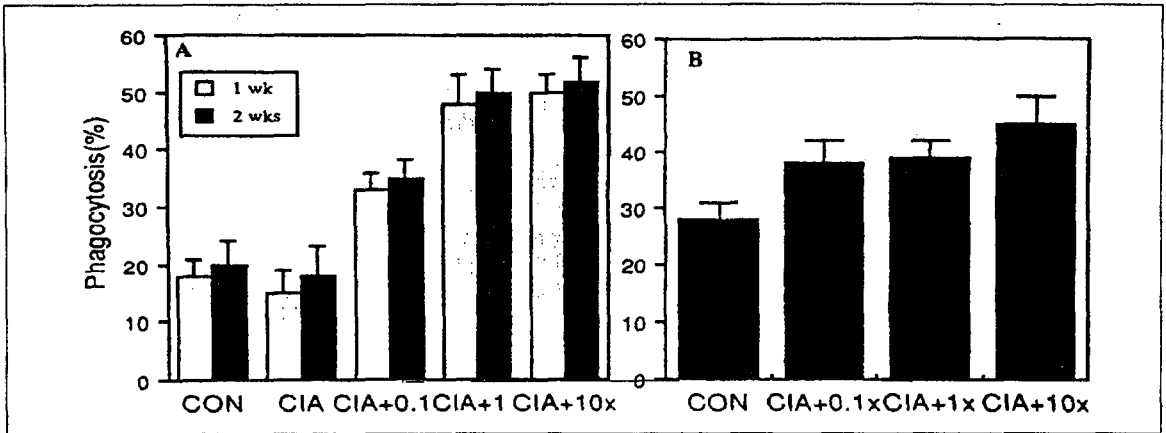


Fig. 1. In vitro and In vivo effects of GM on phagocytic activity. Rat synoviocytes were incubated with GM for 6 hrs. The cells were harvested, centrifuged and measured for phagocytic activity. A significant increment of phagocytic activity was shown in three mouse groups(GM0.1x, GM1x, GM10x). the phagocytic activity was calculated by means of Consort 30 program FACStar. The above data show mean  $\pm$ SD of three experiments. CIA(collagen-induced arthritis) is a collagen immunized group. After 2<sup>o</sup> collagen immunization, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured.

The components of administrated drug as followed :

GM1x, 1xGM : DW = 1 : 100

GM1x, 1xGM : DW = 1 : 10

GM10x, 1xGM : DW = 1 : 1

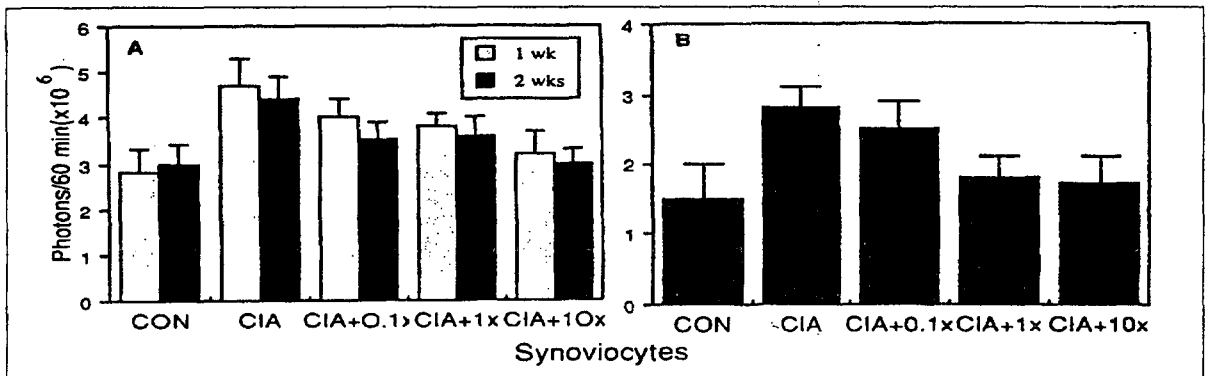


Fig. 2. In vitro and In vivo effects of GM administrations on the superoxide radical formation. A : After rats were given the drug orally for 14 days, rat synoviocytes were incubated with at 37<sup>o</sup> C for 6hrs before determination of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. B : Rat synoviocytes were incubated with various cocentration of MDP. Chemiluminogenic probe was done with 10mM of lucigenin(10, 10' dimethyl-9, 9-biacri-dinium : DBN2+), Which is amplifying superoxide radicals. Rat synoviocytes(1.0x10<sup>6</sup>cells/300 $\mu$ l) were stimulated by 5.3 $\mu$ M phorbol myristate acetate(PMA), and the measurement of superoxide radicals was carried out in the chemiluminometer for 60 minute at 37<sup>o</sup> C. The components of administrated drug are the same as in Fig.1. CIA(collagen-induced arthritis) is a collagen immunized group. After 2<sup>o</sup> collagen immunization, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured. The above data show mean  $\pm$ SD of three experiments

/ml, 10%우태아血清이 들어 있는 MEM完全培池에 분주하여 培池는 3-5일에 한번씩 交替하였다. 7-10일동안 培養한 後 0.5% Trypsin-0.03M EDTA로 4分동안 處理하여 떼어낸 細胞를 계속 계대培養하여 4번째에 特別한 표지마커없이 典型의 纖維芽細胞 形態를 確認한 後 nitrite測定과 反應酸素 中間物質生成程度를 알아보았다.

(9) synovial纖維芽細胞의 反應窒素中間物質 (RNIs: Reactive nitrogen Intermediates) 測定

위의 같은 方法으로 synovial 細胞를 培養한 後 安定하게 바닥에 附着되어 자란 狀態에 있는 synovial 纖維芽細胞는 HBSS로 洗滌한 後 Neuman-Tytell培池(1ml/well)로 갈아준뒤 LPS (10 $\mu$ g/ml)로 刺戟하고 2mM의 NGMMA와 GM 2 를 處理한 後 72時間 동안 培養 한 後에 각 well

로 부터 100 $\mu$ l씩의 培養液을 取하여 ELISA TiterTek plate에 옮긴 後 同量의 Griess Reagent(1:1, v/v, N-1-naphthylethyldiamine 0,1% in H<sub>2</sub>O, sulfanilamide 1% in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 添加하고 10分간 室溫에 두었다. 全體 RNI TiterTek Multiscan MCC/340(Flow Lab)으로 540nm에서 吸光度를 測定했다.

(10) Urine에서 NO측정

2次 免疫後 各 濃度의 檢液을 投與한 날부터 metabolic cage에서 飼料로 부터의 汚染을 防止하기 위하여 물만을 주면서 24時間 동안 urine을 받았다. 收集한 urine은 微生物 汚染을 막기 위하여 200ul의 6N HCl을 튜브에 넣고 NaOH, ZnSO<sub>4</sub>로 不純物을 沈澱시킨後 10分동안 10,000 rpm으로 遠心分離하여 精製하였다. Nitric oxide의 量은 Griess試藥으로 定量하였다.

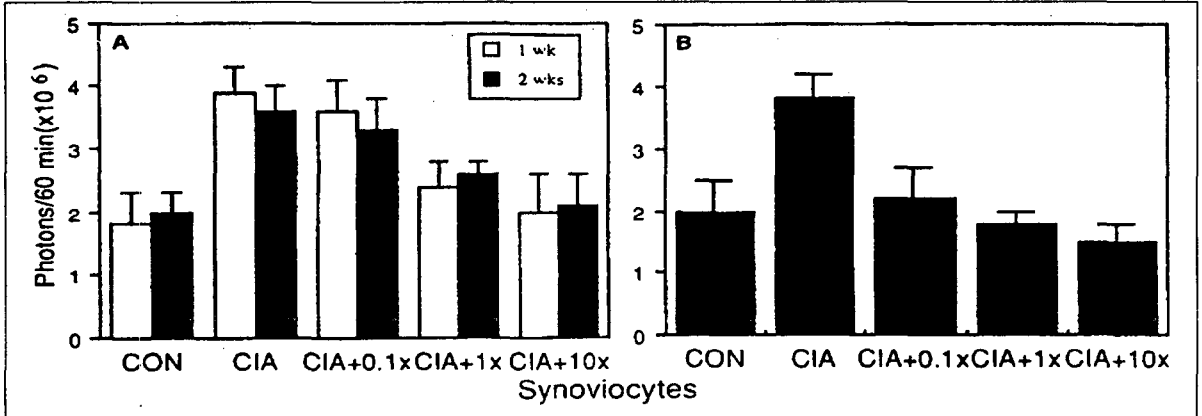


Fig. 3. In vitro and In vivo effects of GM administrations on the hydrogen peroxide radical formation. A : After rats were given the drug orally for 14 days, rat synoviocytes were incubated with at 37° C for 6 hrs before determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B : Rat synoviocytes were incubated with various concentration of GM. Chemiluminogenic probe was done with 10mM of luminol (5-amino-2, 3-dihydro 1, 4-phthalazinedione), which is amplifying hydrogen peroxide radicals. Rat synoviocytes(1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/300 $\mu$ l) were stimulated by 5.3  $\mu$  M phorbol myristate acetate(PMA), and the measurement of hydrogen peroxide radicals was carried out in the chemiluminometer for 60 minute at 37° C. The components of administered drug are the same as in Fig.1. CIA(collagen-induced arthritis) is a collagen immunized group. After 2° collagen immunization, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured. The above data show mean  $\pm$  SD of three experiments.

### III. 實驗 成績

#### 1. Collagen에 의한關節炎(CIA)의 進行에 따른 大食細胞의 貪食能에 미치는 秦芫의 效果

各 그룹의 랫트는 3마리씩이었으며 CIA를 誘發할수있는 type II collagen을 3週 間隔으로 두 차례 꼬리의 基部에 注射하였다. 對照群의 貪食能은 約 19%이며 2次 免疫 後 秦芫를 投與하여 大食細胞의 貪食能을 分析하여 본 結果 collagen으로 注入한 後 秦芫를 먹이지않은 群의 貪食能이 約 17%로 減少한 反面 2次 免疫 後 各 濃度의 韓藥을 投與하여 1週와 2週제의 大食細胞의 貪食能을 比較한 結果 GM 1, GM 2 그리고 GM 3의 貪食能이 各各 約 33%, 47%, 49%로 對照群과 collagen을 注入한 群에 比하여 增加함을 알수 있었으며 韓藥 投與 2週제가 1週제보다 대체적으로 貪食能이 增加 됨을 알수 있었다(Fig. 1A). 또한 正常 랫트의 大食細胞를 培養하여 各 濃度의 秦芫를 大食細胞에 處理한 結果 PBS를 投與한 對照群의 貪食能이 約 28%이며 GM 1, GM 2와 GM 3의 貪食能이 各各 38%, 39%, 41%로 增加 하였다. 이의 結果들로 因하여 CIA에 의한 關節炎의 進行以前에 秦芫의 投與는 大食細胞의 貪食能을 向上시켜 免疫 反應을 進行시킴을 알수있다.(Fig. 1B)

#### 2. Collagen에 의한關節炎 進行에 따른 synoviocytes의 反應 酸素 中間 物質 生成에 미치는 秦芫의 效果

CIA를 誘發할수있는 collagen type II를 꼬리의 基部에 注射하여 2次 免疫 後 各 濃度의 秦芫를 投與하였다. 以上의 랫트에서 synoviocytes를 分離, 培養하여 PMA로 刺戟하여 luminol에 의한 細胞內 superoxide의 發生程度를 測定한 結

果가 Fig.1A이다. 對照群의synoviocytes에서 superoxide의 發生量이  $2.8 \times 10^6$  cpm이며 collagen을 注入한 後 秦芫를 投與하지 않은 群의 superoxide의 發生量은  $4.5 \times 10^6$  cpm으로 對照群에 比하여 상당히 많은量이 生成됨을 알수 있었다. 또한 collagen을 注入한 後 秦芫를 各 濃度로 投與한 實驗群에서 superoxide發生程度는 秦芫의 各 濃度에 依存的으로 superoxide의 發生을 抑制하는 效果가 있음을 알수 있었다. 그러나 秦芫 投與後 1週와 2週제의 synoviocytes의 superoxide의 發生에는 약간의 減少를 보이고 있기는 하나 별다른 差異가 없음을 알수 있다(Fig. 2A). 正常 랫트의 synoviocytes를 分離 培養한 後 GM 1, GM2, GM 3를 處理하여 superoxide의 發生程度를 測定한 結果 collagen으로 2次 免疫만 하여 PMA로 刺戟한 群이 對照群보다 더 많은 量의 superoxide를 내고 있음을 알수 있었고 역시 秦芫의 濃度 依存的으로 減少하는 傾向을 보이고 있으며 1週와 2週제의 差異는 없었다(Fig. 2B).

위와 同等한 對照群과 實驗群을 使用하여 synoviocytes를 pma로 刺戟하여 lucigenin에 의한 細胞內 hydrogen peroxide의 細胞內 發生程度를 測定한 結果 生體內 實驗에서는 PMA로 刺戟한 對照群에 比하여 collagen으로 免疫만하고 秦芫를 投與하지않은 그룹을 PMA로 刺戟하였을때 많은 量의 hydrogen peroxide를 生成했으며 秦芫의 濃度依存的으로 抑制시킴을 볼수 있었다(Fig. 3A). 生體外 實驗에서는 對照群에 比하여 秦芫의 hydrogen peroxide의 抑制能을 볼수 있었으며 이는 對照群의 水準으로까지 抑制함을 볼수 있다(Fig. 3B).

#### 3. Collagen에 의한關節炎(CIA) 進行狀態에 따른 synoviocytes에서 腫瘍壞死 因子(Tumor necrosis factor alpha: TNF- $\alpha$ )의 生成에 미치는 秦芫의 效果



各 그룹의 랫트에 COLLAGEN으로 2次免疫을 시켜 秦芫를 濃度 別로 投與한 後 各 1週와 2週째의 synoviocytes를 分離 培養하여 維持 하였다. collagen으로 免疫도 하지 않으면서 秦芫도 投與하지 않은 對照群과 collagen으로 免疫은 하였지만 秦芫는 投與하지않은 CIA群 그리고 collagen으로 免疫도 하면서 韓藥도 投與한 群을 實驗群으로하여 synoviocytes을 分離하여 TNF- $\alpha$ 의 生成 程度를 測定하였다. 그 結果는 Table 1에서 보여준 것처럼 1週째의 TNF- $\alpha$ 의 生成은 對照群이  $1.32 \pm 0.02$ , CIA군이  $2.91 \pm 0.04$  그리고 CIA+0.1X, 1X, 10X 各各은  $2.72 \pm 0.02$ ,  $2.18 \pm 0.03$ ,  $1.50 \pm 0.02$ 로 秦芫의 濃度에 依存的으로 減少하는 傾向이 뚜렷하였다. 또한 2 週째의 synoviocytes에서의 TNF- $\alpha$ 의 生成은 對照群이  $1.28 \pm 0.03$ 이며 CIA群이  $3.51 \pm 0.03$ 으로 增加하였으나 秦芫를 濃度 別로 處理하였을 경우 對照群의 水準으로 減少하는 傾向이 뚜렷하였다(Table 1).

Table 1. TNF- $\alpha$  secretion in the synoviocytes by collagen-induced arthritis(CIA) progressed model.

Dose	1 wk	2 wks
CON	$1.32 \pm 0.02$	$1.28 \pm 0.03$
CIA	$2.91 \pm 0.04$	$3.51 \pm 0.03$
CIA + GM0.1 $\times$	$2.72 \pm 0.02$	$2.79 \pm 0.04$
CIA + GM1 $\times$	$2.18 \pm 0.03$	$2.36 \pm 0.04$
CIA + GM10 $\times$	$1.50 \pm 0.02$	$1.95 \pm 0.03$

GM-treated synoviocytes were cultured with medium, or various concentration of GM. The amount of TNF- $\alpha$  secretion by synoviocytes were measured after 48 hrs incubation. Values are means  $\pm$  SD of for experiments. Control is collagen immunized group. After 2<sup>o</sup> collagen immunization, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured.

#### 4. Collagen에 의한 關節炎(CIA) 進行狀態에 따른 T 림프구의 增殖 抑制에 미치는

#### 秦芫의 效果

秦芫의 投與가 Collagen에 의한 關節炎(CIA)의 進行狀態에 따른 림프구 增殖에 미치는 影響을 알아보기 위하여 림프구의 增殖反應을 [<sup>3</sup>H]-thymidine이 單位時間內에 細胞內로 誘入되는 程度로 測定하였다. 對照群은 正常 랫트의 림프구를 分離하여 實驗하였고 對照群은 collagen으로 免疫 後 秦芫를 投與하지않고 림프구를 分離한 群이며 實驗群은 collagen免疫 後 秦芫를 投與하여 림프구를 分離한 群이다. 免疫後 秦芫를 投與한 後 1週째 成績은 對照群이  $4.4 \pm 0.5 \times 10^3$ cpm이며 CIA群은  $9.8 \pm 0.2 \times 10^3$ cpm인 反面 CIA+0.1X, 1X, 10X는 各各  $8.7 \pm 0.3 \times 10^3$ cpm,  $5.4 \pm 0.2 \times 10^3$ cpm,  $4.5 \pm 0.1 \times 10^3$ cpm으로 減少 效果를 나타내었다. 한편 2週째의 成績 역시 對照群에 비하여 顯著的 減少效果를 나타냄을 알수 있었으며(Table 2) 關節炎에 있어 T 림프구가 重要한 役割을 하는며 秦芫를 投與하였을 경우 림프구 增殖을 抑制하여 進行을 緩化시킬수 있음을 示唆한다.

Table 2. Effects of GM on antigen stimulated (<sup>3</sup>H)-thymidine incorporation in the spleen lymphocytes from drug-treated rats.

GM Dose	Proliferation ( $\times 10^3$ cpm)	
	1 wk	2 wk
CON	$4.4 \pm 0.5$	$3.8 \pm 0.3$
CIA	$9.8 \pm 0.2$	$11.5 \pm 0.3$
CIA + GM0.1 $\times$	$8.7 \pm 0.3$	$7.9 \pm 0.2$
CIA + GM1 $\times$	$5.4 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.3$
CIA + GM10 $\times$	$4.5 \pm 0.1$	$4.3 \pm 0.3$

Spleen lymphocytes( $10^5$ cell/well) were stimulated with various GM concentration incubated for 7 days at 37<sup>o</sup> C in 5%CO<sub>2</sub> humidified air.  $1 \mu$ Ci of (<sup>3</sup>H)-thymidine(47Ci nM) was then added to each well. After 4 hrs incubation and (<sup>3</sup>H)-thymidine incorporation was measured in beta counter. The data are expressed as mean total c.p.m $\pm$ SD of three experiments.

Control is a collagen immunized group. After 2° collagen immunization, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured.

### 5. Collagen에 의한 關節炎(CIA)의 進行 狀態에 따른 synoviocytes에서 反應窒 素中間物質(RNI)의 生成

正常 랫트의 synoviocytes를 分離 培養하여 nitric oxide(NO)의 生成程度를 測定한 結果 對照 群의 NO生成程度는  $8 \pm 2$ 이며 LPS를 處理한 그 룩은  $51 \pm 5$ , NGMMA를 處理하여 NO發生을 抑 制한 結果 對照群 水準으로 떨어졌으며 GM 2를 處理한 群의 NO生成은 약간의 NO를 生成하여 正常 對照群 보다 약간 높은 數值를 나타냈으며 LPS를 處理한 後 GM 2를 處理하였을 경우 GM 2가 LPS에 의한 NO의 生成을 抑制하는것으로 밝혀졌다(Fig. 4)

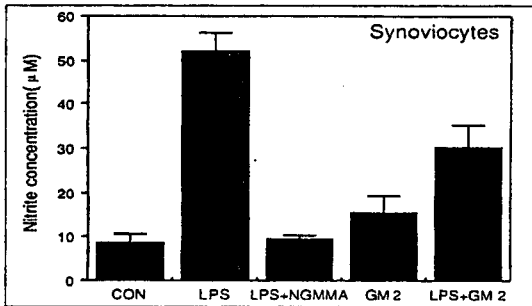


Fig. 4. Effects of GM on the production of NO by rat synoviocytes.

Synoviocytes from the knee joints of rats were placed directly into 96 well plates with 250µl of Neuman-tytertek medium in the preence of LPS(10mg/ml) and NGMMA,GM. Conditioned media were recovered with after 48hrs of incubation and assayed for nitrite. Dose dependent effects of GM on the Nitrite production. The amount of NO<sup>2-</sup> released by synoviocytes was measured after 48 hrs of incubation. CIA(collagen-induced arthritis) is a collagen immunized group. After 2° collagen immuni-

zation, the term of 1 wk and 2 wks means values of each experiment measured. Values are mean  $\pm$  SD of four experiments.

### 6. Collagen에 의한 關節炎(CIA) 進行狀 態에 따른 urine에서 nitric oxide(NO) 分泌에 미치는 秦芫의 效果

各 그룹의 랫트에 1, 2次 collagen으로 免疫 後 秦芫가 尿로 分泌되는 NO에 미치는 效果를 알아 보았다. 正常 對照群의 尿에서 NO量이 거 의  $15 \mu\text{M}$ 以下로 거의 分泌되지 않은 反面 collage으로 免疫만 시킨 경우의 NO의 分泌量은 免疫 後 5日째에 最大로 增加되기 始作하였고 以 後 若干의 減少하는 傾向을 보였다. 또한 2次 免疫 後 秦芫를 投與한 群의 尿에서 NO分泌量을 본 結果 全般的으로 對照群보다 NO의 分泌程度 가 減少하는것을 確認 할 수 있었으며 이는 秦芫 가 尿로 no의 分泌를 抑制하는 效果가 있음을 確 認하여 주는 結果이다.(fig.5)

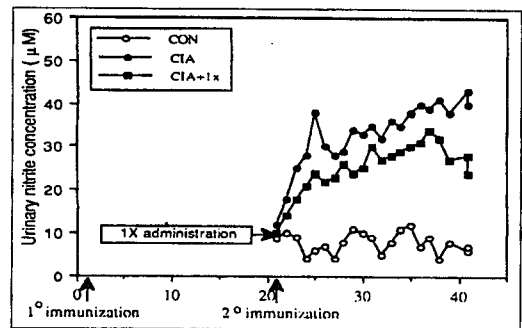


Fig. 5. Urinary nitrite production in the collagen induced arthritis(CIA) progressed model. Animals were treated daily with saline or test drug after 2° collagen immunization. Urine(24hrs) was collected every weeks. Values are mean  $\pm$  SD of four experiments.

## IV. 考 察

류마티스 關節炎은 原因 不明의 慢性 炎症性

疾患으로 關節內 滑液膜炎이 基本 病變이며, 이 炎症이 서서히 進行하여 軟骨과 軟骨下骨, 그리고 周圍 軟體 組織들의 破壞를 招來하는 自家 免疫 疾患의 一種이다<sup>20,25,56</sup>. 류마티스 關節炎에서 炎症 初期에는 滑液膜 周圍細胞들의 肥厚가 觀察되고 림프구, 大食細胞, 形質細胞, 그리고 多型核 白血球가 血管周圍에 侵潤을 일으킨다. 滑液膜에서 滑膜細胞와 侵潤細胞들의 相互作用에 의해 림프구의 活性化가 增加되고 毛細血管에서 滑液膜 間質로 細胞의 移動이 增加되고 따라서 림프구와 纖維芽細胞의 流入이 늘어나면서 關節組織을 破壞하는 것으로 알려지고 있다<sup>25</sup>. 또한 류마티스 關節炎의 癒病率은 아직 確實한 調査는 不足하지만 우리나라 人口의 約 1%程度로 여겨지며, 女子가 男子보다 2-3倍 程度 頻도가 높으며, 80%가 30-50歲 사이에서 發病하는 것으로 알려지고 있다<sup>23</sup>. 그러나 아직까지도 正確한 原因 및 治療藥物이 開發되지 않아서 이에 對한 研究가 進行中이다.

痺證은 氣血이 不足하거나 氣血運行이 不暢하여 筋脈關節의 濡養이 失調되거나 腠理가 空疏할 때 風寒濕의 邪氣에 感受되어 肢體 및 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着을 일으키는 活動障礙를 主症狀로 하는 病變으로<sup>33,36,57</sup>, 西洋醫學의으로는 류마티스熱, 류마티스 關節炎, 痛風, 坐骨神經痛, 腰筋緊張, 纖維組織炎, 骨化性骨炎 등이 모두 本證의 範疇에 屬한다<sup>58</sup>. 臨床證狀에 따라 多樣하게 分類되는 痺證은 治療 또한 여러 方法이 活用되고 있으며, 藥物療法으로는 風寒濕熱의 邪氣에 의한 境遇는 邪氣의 輕重에 따라 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 活血祛瘀, 祛痰藥物들을 適切히 配合하여 利用하고, 虛弱한 患者의 境遇는 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝藥物들을 應用한다 하였다<sup>39</sup>.

이들 藥物中에 祛風藥物로는 秦艽가 多用되고 있는바, 秦艽는 龍膽科에 屬한 多年生草本인 秦艽의 根을 乾燥한 것으로<sup>6-7</sup>, 異名으로는 秦膠, 秦料, 秦瓜, 左秦艽, 大艽, 左寧根, 左丑, 西秦艽, 夢卜艽, 辮子艽, 左寧, 大葉龍膽等<sup>59-63</sup>이 있다. 性

味는 苦辛, 平, 無毒<sup>1,2,4</sup>하며, 『本草綱目』<sup>64</sup>에 보면 手足陽明經과 肝, 膽經으로 歸經한다 하였다.

秦艽는 祛風除濕, 和血舒筋, 清熱利濕과 去陽明之濕熱등의 效能이 있어, 風濕痺痛, 筋骨拘攣과 黃疸, 便血, 骨蒸潮熱, 小兒疳熱, 小便不利, 頭風痛, 口噤牙痛 및 手足不遂 등의 主治를 가지며<sup>6,65-69</sup>, 臨床의으로는 關節痛, 頭痛, 牙痛, 流行性 腦脊髓膜炎, 小兒急性黃疸性傳染性肝炎, 腦卒中後遺症의 半身不遂, 腰痛, 盜汗, 神經痛 등에 應用되어 왔다<sup>6,9,70-71</sup>. 한편 成分으로는 alkaloids인 gentianine, gentianidine, gentianol과 gentialutine, gentioflavine, gentiopicroside, 糖類, 精油 등이 含有되어 있는 것으로 報告되고 있다<sup>2,6,7,16,72</sup>.

秦艽의 藥理作用은 中樞神經作用으로 鎮痛, 鎮靜, 鎮痙 및 催眠作用<sup>9,10</sup>을 나타내며, 抗histamine과 抗anaphylatic shock의 作用<sup>7</sup>이 있으며, 痢疾菌, 炭疽菌, 티푸스菌, 黃色葡萄狀球菌, 白色葡萄狀球菌, 인플루엔자杆菌 등을 抑制하는 抗菌作用<sup>12</sup>과 白癬菌, 黃癬菌, 表皮絲狀菌, 羊毛性小孢子癬菌 등을 抑制하는 真菌作用이 報告되고 있다<sup>72</sup>. 또한 adrenaline을 分泌시킴으로써 血糖上昇 作用이 있으며<sup>2,7</sup>, 15%의 酵母懸濁液과 알콜抽出液은 實驗動物쥐에서 解熱作用이 있고<sup>8</sup>, 이 밖에도 ethyl alcohol 抽出液은 癡醉된 動物의 血壓을 下降시킨다는 報告가 있다<sup>74</sup>.

한편 秦艽의 成分中 gentianine는 實驗쥐에서 足關節의 浮腫을 減少시키는 抗炎症效果를 나타내는데<sup>13</sup> 이는 aspirin보다 2培程度 強力하며, 이러한 抗炎症作用은 間接적으로 下垂體를 刺戟하여 corticotropin分泌를 增加시켜 副腎皮質機能을 亢進시킴으로써 나타난다<sup>17</sup>. 또한 臨床의으로 gentianine의 抗炎症效果가 關節炎에 有效하다고 報告되고 있다<sup>15</sup>. 그러나 gentianine 100mg을 經口投與時 副作用으로 惡心, 嘔吐 및 胃腸管 障礙가 發生할 수 있다<sup>17</sup>. gentiopicroside는 랫트에서 carrageenin에 의해 誘發된 足浮腫反應을 抑制하는 抗炎症作用을 나타내며<sup>75</sup>, 免疫學的으로

Kondo等에 의해 實驗的으로 誘發시킨 肝損傷에서 TNF生成을 抑制하는 作用이 報告되고 있다<sup>76)</sup>. 또한 Yuan等은 秦艽의 構成 成分中 gentiopicoside를 全身性紅斑性浪瘡에 使用하여 有效하다고 報告하였다.<sup>77)</sup>

上述한 內容으로 보아 秦艽가 鎮痛作用과 抗炎症作用이 있어 류마티스 關節炎의 治療에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

韓藥材가 關節炎에 미치는 實驗研究로, CIA의 發生에 第2型 collagen에 대한 體液性 및 細胞性 免疫反應들이 重要な 役割을 함이 밝혀지면서<sup>78-80)</sup>, 大羌活湯<sup>40)</sup>, 桂枝芍藥知母湯<sup>41)</sup>, 骨膽草<sup>42)</sup>가 CIA型 關節炎에 미치는 影響이 報告 되었으나, 秦艽에 대한 實驗報告는 아직 없다.

CIA는 류마티스 關節炎의 動物實驗 모델로 開發되어 류마티스 關節炎의 免疫學的 機轉의 研究와 治療 藥物의 藥理 效果를 檢査하는데 利用되는 方法中의 하나이다. 이러한 利用은 류마티스 關節炎이 發病되었을 때 나타나는 症狀과 CIA가 類似한 症狀을 나타내는데 根據하고 있다. 그러나 CIA는 류마티스 關節炎과는 달리 collagen을 注射하여 誘導한 抗原 誘導性 自家 免疫 疾患이기 때문에 류마티스 關節炎에서 나타나는 皮下結節, 肺纖維狀皮과 같은 合併症이 나타나지 않고 發病期間이 比較的 짧으며 rheumatoid factor가 檢出되지 않는 等의 病理學的 및 免疫學的 特徵의 差異를 나타내는 것으로 報告되고 있다<sup>26)</sup>. 그러나 류마티스 關節炎에서와 마찬가지로 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6와 같은 炎症關聯 cytokines들은 CIA進行에 決定的 役割을 하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>28,30,81)</sup>.

本實驗은 秦艽가 collagen 誘發 關節炎에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 秦艽煎湯液을 CIA가 誘發된 마우스에 投與하여 大食細胞의 貪食能, T 림프구의 增殖, 尿에서 nitric oxide의 分泌, synovocyte에 의한 ROI, TNF- $\alpha$  및 nitric oxide의 生成에 미치는 影響을 調查하였다.

류마티스 關節炎이 滑膜의 慢性炎症으로 特徵

지어지기 때문에 多樣한 免疫學的 異常들을 나타내어 이 疾患의 病因에 免疫學的 機轉이 關與하는 것으로 報告 되고 있으며, 細胞性 및 體液性 免疫反應들이 류마티스 關節炎의 發生에 重要な 役割을 하는 것으로 알려져 있고, 滑膜에서는 T림프구, B 림프구 및 大食細胞가 活性化 된다<sup>82)</sup>. 따라서 CIA에서 抗原 傳達 細胞에 의해 活性化된 T細胞의 刺戟으로 腹腔內 大食細胞가 貪食能을 나타내는지를 알아본 結果 CIA進行中에 秦艽를 投與하였을 경우 生體外 生體內 모두에서 大食細胞의 貪食能이 增加됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 이러한 結果는 류마티스 關節炎의 進行中에 秦艽를 投與하여 大食細胞의 貪食能을 增加시켜 免疫機能을 亢進시켜 류마티스 關節炎의 進行을 緩化시킬 수 있으리라 思料된다.

류마티스 關節炎의 免疫學的 病因에 重要な 役割<sup>83)</sup>을 하고 있는 T림프구는 류마티스 關節炎에서 림프구가 豊富한 部位에는 주로 補助 T細胞로 構成되어 있고, 周圍部는 주로 抑制 T細胞뿐 아니라 大食細胞와 形質細胞가 侵潤되어 있어 이곳에서 免疫 글로블린과 류마티스 因子가 生産된다<sup>82-83)</sup>. 따라서 이 論文에서는 CIA進行中에 秦艽를 投與하여 T 림프구 增殖에 미치는 效果를 알아본 結果 秦艽의 投與로 림프구 增殖을 抑制하고 있음을 알 수 있었다(Table 2). 이는 秦艽의 投與가 T 림프구 增殖을 抑制하여 류마티스 關節炎의 豫防과 治療에 效果를 나타낼 수 있음을 示唆한다 하겠다.

TNF- $\alpha$ 는 주로 주로 活性化된 大食細胞에 의해 生成되는 炎症性 cytokine으로써, 細胞性 免疫反應에 重要な 役割을 하며, 宿主의 다른 cytokines의 生成을 增加시킨다. 또한 류마티스 關節炎의 重要な 病因中의 하나로 作用하고 있으며<sup>84)</sup>, Gram 陰性杆菌 感染에 同伴한 發熱, 쇼크, 好中球의 活性度等은 TNF 또는 TNF의 刺戟으로 生成되는 IL-1에 의해 惹起된다<sup>85)</sup>. 最近에는 炎症性 疾患에 重要な 役割을 하는 TNF를 抑制하는

治療劑 開發에 關心이 集中되고 있다<sup>84)</sup>. 本 研究에서는 CIA進行中에 秦芫를 投與하여 TNF- $\alpha$  生成의 抑制에 미치는 影響을 實驗한 結果 濃度依存的으로 抑制效果가 있음을 알았다(Table 1). 이는 Kondo 等<sup>76)</sup>이 秦芫의 成分中 gentiopicroside가 TNF抑制效果가 있다는 報告와도 一致하는 面이 있다. 이러한 結果는 秦芫가 TNF- $\alpha$  生成을 抑制함으로써 炎症反應을 緩化시켜 류마티스 關節炎의 進行을 抑制할 수 있을 것으로 思料된다.

好中球,好酸球 및 血液의 單核球나 組織의 大食細胞等이 이루는 單核食系에 屬하는 細胞들은 食作用을 修行하거나 여러 cytokines에 의하여 刺戟받으면<sup>85)</sup> 食細胞膜에 存在하는 NADPH oxidase라는 酵素에 의하여  $O_2^-$ 나  $H_2O_2$ 와 같은 ROI를 生成하고<sup>21)</sup>, 이렇게 生成된 ROI는 食食된 phagosome內的 微生物을 死滅시키는 宿主의 防禦機能을 擔當하기도 하지만, 過多하게 生成된 ROI는 周圍 組織에 遊離되어 炎症反應時 觀察되는 組織破壞의 가장 重要한 原因이 되기도 한다<sup>86)</sup>. 本 研究에서는 CIA進行中에 秦芫를 投與하였을 경우 synoviocytes에서 ROI生成이 抑制되는지를 알아보았다. 그 結果 秦芫를 濃度 依存的으로 投與하였을 때 ROI가 抑制되었다(Table 1, Fig.5). 이러한 結果는 秦芫의 投與가 組織損傷을 招來하는 炎症反應을 緩化시킬 수 있다는 것을 보여주고 있으며, 秦芫의 抗炎症作用과의 關聯性을 示唆한다 하겠다.

L-arginine으로부터 끝쪽 窒素 原子를 NO (nitric oxide) 合成 酵素가 酸化시키고 자르면서 生成 되어지는 NO<sup>87)</sup>는 身體의 여러 種類에서 分泌되며 分泌된 NO는 大部分의 組織細胞에 影響을 미치는데 神經系에서는 神經傳達物質로서의 役割과 神經組織에 對하여 神經毒性으로 作用하며, 免疫系와 心血管系에서는 박테리아를 殺害하고, 바이러스의 增殖을 抑制하며, 敗血性 쇼크와 같은 病態學的 條件을 調節하는 作用과 內分泌性 血管擴張劑로써 作用한다<sup>88)</sup>. 大食細胞 或은 好中球들이 適切한 cytokines으로 刺戟되면 刺戟된

細胞들은 NOS(nitric oxide synthase)를 많이 發現시켜 많은 量의 NO가 生成된다. 많은 量의 NO는 免疫炎症部位에 遊離되어 周圍 正常組織에 損傷을 招來할 뿐만 아니라 免疫系에서 中樞的 役割을 擔當하는 림프구에도 影響을 미쳐 免疫炎症反應時의 組織損傷이나 免疫反應結果 招來되는 自家免疫疾患을 惹起시킬 수 있다<sup>89)</sup>. 또한 NO는 류마티스 關節炎에 關與한다는 事實과 함께 軟骨細胞와 synoviocytes 그리고 白血球에 의해 이 疾患을 앓고 있는 患者의 滑液 內에서 nitrite가 繼續 增加한다고 報告된바 있다<sup>90-92)</sup>. 本 實驗에서는 CIA進行中에 秦芫를 投與하여 synoviocytes와 urine에서 NO의 生成과 分泌가 抑制되는가를 알아보았다. 그 結果 秦芫의 投與는 synoviocytes에서의 NO의 生成을 濃度 依存的으로 抑制하였다(Fig.4). 또한 urine에서 NO의 分泌抑制 效果가 있음이 觀察되었다(Fig.5). 이러한 結果는 秦芫가 NO에 의한 組織損傷을 招來하는 炎症反應을 緩化시켜 류마티스 關節炎의 進行을 抑制하는데 重要한 意味가 있을 것으로 思料된다.

以上の 結果로 보아 秦芫는 大食細胞의 食食能을 增加시켜 免疫機能을 亢進시키고, 림프구 增殖, NO, NOI, TNF- $\alpha$ 의 生成을 抑制함으로써 류마티스 關節炎의 豫防과 症狀緩化에 活用될 수 있다 하겠다.

다만 本 研究에서는 CIA進行中에 抗炎症劑로써 關節炎의 治療에 利用되는 秦芫를 미리 投與함으로써 어떠한 免疫學的 變化를 誘導하는지 알아본 것이므로, 앞으로 多樣한 觀點에서 秦芫에 의한 cytokines, chemokines 等の 變化와 免疫擔當細胞들의 分子生物學的 遺傳子 發現關係等 이 더 研究되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結論

Collagen에 의하여 誘發되는 關節炎의 進行時 秦芫의 投與가 이 모델의 免疫反應을 어떻게 調

節하는지를 알아보기 위하여 實驗을 한 結果 다 음과 같은 結論을 얻었다.

1. 秦艽의 投與는 生體內와 生體外에서 貪食細胞에 의한 貪食能을 增加시키며 生體內的 結果에서는 2次 免疫 後 더 增加함을 알 수 있었다.

2. 秦艽의 投與는 生體內와 生體外에서 synovocytes에 의한 ROIs生成能을 減少 시켰다.

3. 秦艽의 投與는 synovocytes에 의한 腫瘍壞死因자의 生成을 減少 시켰다.

4. 秦艽의 投與는 T림파구의 增殖을 抑制하였다.

5. 秦艽의 投與는 synovocytes에서 nitric oxide의 生成을 抑制하였다.

6. 秦艽의 投與는 尿에서 nitric oxide의 分泌를 抑制하였다.

以上の 結果로부터 Collagen에 의한 關節炎의 進行時 秦艽의 投與는 免疫反應을 調節하여 有害物質을 통한 組織損傷을 抑制하여 關節炎의 進行을 緩化시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 秦艽는 류마티스 關節炎의 治療에 臨床的으로 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

## 참고문헌

1. 康秉秀 外 : 本草學, 永林社, 서울, pp,264-265, 1991
2. 陸昌洙 外 : 漢藥의 藥理·成分·臨床應用, 癸丑文化社, 서울, pp,494-495, 1982
3. 聶慶喜 : 中藥材學, 科學出版社, 北京, pp,129, 1993
4. 中華人民共和國衛生部藥典委員會 : 中華人民共和國藥典, 人民衛生出版社, 北京, pp,242-243, 1990
5. 吳普 : 神農本草經, 醫道韓國社, 서울, 券2 pp, 10, 1976
6. 新文豐出版公司 : 新編中藥大事典(第2冊), 新文豐出版公司, 台北, pp,1567-1569, 1982
7. 李尙仁 : 漢藥臨床應用, 成輔社, 서울, pp, 202-203, 1982
8. Louise G.Hutchins 外 : 本草中數種藥材對於大白鼠體溫之影響, Chin.J.Physiol, Vol.11, NO.1, pp,35-40, 1937.
9. 王浴生 : 中藥 藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, pp,856-857, 1983
10. 劉壽山 : 中藥研究文獻摘要, 科學出版社, 北京, pp,506-509, 1975.
11. 康秉秀 外 : 臨床配合本草學, 永林社, 서울, pp.648-649, 1994
12. 王嶽 外 : 70種藥用植物抗菌效能的試驗, 植物學報, 3卷2期, pp,121-131, 1954.
13. Sung C Y 外 : pharmacology of gentianine. I. Anti-inflammatory effect and action of pituitary-adrenal function of rat, Acta Physiol Sin, 22:201-205, 1958.
14. 鄭復眞 : 中藥治療風濕病簡介, 新醫藥學雜誌, 第9期, pp,12, 1973
15. 蘭洲東風制藥廳科技組 : 秦艽注射液的制備及臨床觀察報告, 中草藥通訊, 第2期, pp,40-41, 1973
16. 高木敬次郎 : 和漢藥物學, 南山堂, 東京, pp,117, 1982
17. KEE CHANG HUANG : The Pharmacology of Chinese Herbs ,CRC press, Boca Raton, pp,159-161, 1993.
18. 김호연 : 류마티스관절염의 病態生理, 醫藥情報, 제19卷 3호, pp,34~37, 1993
19. 박석건 外 : 류마티양 관절염에서 혈청 c-반응성단백에 관한 연구, 대한내과학회지, 제27권 제3호, pp,423~428, 1991
20. 大韓整形外科學 : 整形外科學, 最新醫學社, 서울, pp,109~118, 156, 1991
21. 서울대학교 의과대학 : 면역학, 서울대학교 출판부, 서울, pp,1,123,125,132,134, 1987
22. 羅昌洙 : 頭面 脊椎 四肢病의 診斷과 治療, 大星文化社, pp,453, 1995

23. 박원 : 류마티스 관절염의 정의와 원인, 醫藥情報, 제19권 3호, pp,29~33, 1993
24. 醫學教育研修院 : 家庭醫學, 서울대학교출판부, 서울, pp,593~594, 1987
25. 김호연 : 류마티스 관절염의 면역병인의 최근 경향, 대한내과학회지 제36권 제6호, pp,743-745, 1989
26. Durie, FH., Fava, RA., and Noelle, R.J.: Collagen-induced Arthritis as a model of rheumatoid arthritis, Clinical Immunol Immunopathol 73:11-18, 1994
27. Wooley, PH.: Collagen-induced Arthritis in the mouse, Methods Enzymol Vol.162. pp,361-373, 1988
28. Cooper, WO., Fava, RA., Gates, CA., Cremer, MA., and Towns, AS.: Acceleration of onset of Collagen-induced Arthritis by intra-articular injection of tumor necrosis factor or transforming growth factor-beta, Clin Exp Immunol, 89:244-250, 1992
29. Hom, J.T., Brendele, AM., and Carlson, DG.: In vivo administration with IL-1 accelerates the development of Collagen-induced Arthritis in mice, J Immunol, 141:834-841, 1988
30. Takai, Y., Seki, N., Senoh, H., Yokota, T., Lee, F., Hmaoka, T., and Fujiwara, H.: Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II Collagen-induced Arthritis, Arthritis Rheum, 32:594-600, 1989
31. 周命新 : 醫門寶鑑, 一中社, 서울, pp,224-225, 1990
32. 許浚 : 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, pp,372, 1983
33. 鄭錫熙 外 : 痺症의 分類와 治療에 關한 考察, 韓方物理療法學會誌, 서울, Vol.2 No.1, pp,181-190, 1992
34. 李東垣 : 東垣十種醫書, 大星文化社, 서울, pp,480-481, 1983
35. 張介賓 : 景岳全書(上), 大星文化社, 서울, PP. 229-235, 1988
36. 黃文東 外 : 實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, 上海, pp,554, 1986
37. 上海中醫學院 : 中醫內科學, 商務印書館, 北京, PP,200-205, 1982
38. 婁多峰 : 痺證治驗, 河南科學技術出版社, 河南, pp,1, 1983
39. 姜仁守 : 痺證治療의 用藥에 關한 小考, 大韓韓醫學會誌, 第11卷, 第1號, pp,245-252, 1990.
40. 李昊根 外 : 大羌活湯이 第II型 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는 影響, 韓方物理療法科學會誌, Vol.4 No.1, pp,87-97, 1994
41. 申炳熙 外 : 桂枝芍藥知母湯이 第II型 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는 影響, 韓方物理療法科學會誌, Vol.4 No.1, pp,121-131, 1994
42. 嚴載元 : 骨擔草가 第II型 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는 影響, 韓方物理療法科學會誌, Vol.5 No.1, pp,149-159, 1995
43. Schmid, D. S. : The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4+,CD8- T cells and is restricted to the DR region of the MHC complex, J Immunol, 140:3610-3616, 1988.
44. Soerskaar, D., Foerre, Oe., Albrechtsen, D. and Slavem, P. : Natural cytotoxicity in adult acute leukemia. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 86:190-195, 1988.
45. Davis, A.J.S. et al : The failure if thymus-derived cells to produce antibody, Transplantation, 5:222, 1967.
46. Austyn, J.M. and Gordon, S. : F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage, Eur.J Immunol., 11:805-815, 1981.

47. Hume, D.A., Perry, V.H. and Gordon, S. : The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F40/80: macrophages associated with epithelia, *Anat.Rec.*, 210:503-512, 1984.
48. Hume, D.A., Loutit, J.F. and Gordon, S. : The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F40/80: macrophages of bone and associated connective tissue, *J.Cell.Sci.*, 66:189-194, 1984
49. Shepherd, V.L., Compbell, E.J., Senior, R.M. and Stahl, P.D. : Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes, *J.Reticuloendothel Soc.*, 32:423-431, 1982.
50. Suny, S.S.J., Nelson, R.S. and Silverstein, S.C. : Yeast mannose inhibits binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages, *J. Cell.Biol.*, pp,106, 1983.
51. Walker, W.S., Hester, R.B. and Beelen, R.H.J. : Persistent expression of IgA-antigen on a subpopulation of murine resident peritoneal macrophages, *Cell.Immunol.*, 79:125, 1983.
52. Winter, M. and Buschmann, H.G. : Measuring phagocytic capacity in polymorphonuclear cell of the pig a comparison between different assay, *J.Vet.Med.*, 834:504, 1987.
53. Nemoto, K., T. Mae and T. Takeuchi. : Deoxyspergualin therapy in autoimmune MRL/lpr mice suffering advanced lupus-like disease, *J. Antibiot.* 41:1253-1259, 1988.
54. Stewart, C.C. and Lin. H. : Macrophage growth factor and it's relationship to colony stimulation factor, *Reticuloendothel.Soc.*, 23:269, 1978.
55. Kubo, M. and Archi, S. : G.L. antihypertensive component, *Jpn,Kokai Tokkyo Koho* 81,57801, 1981
56. 변정원 外 : 류마티드 활액막내 혈관내피와 말초단핵세포간의 유착에 관한 연구, *대한내과 학회지*, 第36卷 第6號, pp,746-752, 1989.
57. 陳貴廷 : 實用中西醫結合診斷治療學, 一中社, 서울, pp,637-641, 1991.
58. 婁多峰 : 痺證治驗, 河南科學技術出版社, 河南, pp,1-9, 1983.
59. 鄭普燮 外 : 圖解鄉藥(生藥)大事典(植物篇), 永林社, 서울, pp,478, 1990
60. 顏正華 : 中藥學, 貴州人民出版社, 貴州, pp,198, 1990
61. 全國中草藥匯編 編寫組 : 全國中草藥匯編, 人民衛生出版社, 北京, pp,672, 1983
62. 馬興民 : 新編中藥炮制法, 陝西科學技術出版社, 陝西省, pp,139, 1980
63. 內蒙古自治區革命委員會 衛生局 : 內蒙古中草藥, 內蒙古自治區人民出版社, 內蒙古, pp,434, 1972
64. 李時珍 : 本草綱目, 高文社, 서울, pp,455-456, 1983
65. 吳儀洛 : 本草從新, 杏林書院, 서울, pp,11, 1972
66. 崔樹德 : 中藥大全, 黑龍江科學技術出版社, 河北省, pp,322, 1989
67. 中山醫學院 : 中藥臨床應用, 廣東人民出版社, 廣東省, pp,168, 1976
68. 醫學研究會 : 增補本草備要, 高文社, 서울, pp,125, 1974
69. 顏正華 : 臨床實用中藥學, 人民衛生出版社, 北京, pp,272-273, 1984
70. 山東省人民醫院 : 實用中藥手冊, 山東科學技術出版社, pp,368, 1981



71. 葉橘泉 : 現代實用中藥, 醫林書局, 香港, pp,276-277, 1957
72. W.Tang 外 : Chinese Drug of Plant Origin, pp,551-552, 1992
73. 曹仁烈 外 : 中藥水浸劑在試管內抗皮膚真菌的觀察, 中華皮膚科雜誌, 第4號, pp,286-292, 1957.
74. 李應粹 : 26種植物藥對於麻醉動物血壓的影響, 中國醫學科學院 1956年 論文報告會論文摘要, II, pp,70, 1956.
75. Hayashi T 外 : Antiinflammatory secoidoids, Jpn Kokai Tokkyo Koho, 79:26:323, 1979
76. Kondo 外 : Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice, Planta Med, pp,414-416, 60(5),1994
77. Yuan, ZZ 外 : Observation on the treatment of systemic lupus erythematosus with a Gentiana macropylla complex tablet and a minimal dose of prednisone, Chung Hsi Chieh Ho Tsa Chih, 9(3),pp,133-134, 156-157, 1989
78. 박동준 外 : 흰쥐에서 Type II Collagen으로 유발된 관절염의 임상양상 및 면역반응, 카톨릭大學醫學部論文集, 第43集 第2號, pp,51-468, 1990
79. 박동준 外 : 흰쥐의 제2형 Collagen유발 관절염 : IgG항Collagen항체의 변화, 대한내과학회지, 第41卷 第3號, pp,423-428, 1991
80. Takai T., Jasin HE.: Interactions between anticollagen antibodies and chondrocytes [see comments], Arthritis Rheum, 35:224-230, 1992.
81. Williams, RO., Feldmann, M., and Maini, RN. Proc Natl Acad Sci USA 89:9784-9788, 1992
82. Lasky HP, Bauer K, Pope RM : Increased helper inducer and decreased suppressor inducer phenotypes in the rheumatoid joint [see comments], Arthritis Rheum, 31:52-59, 1988
83. Lipsky PE: Acute nonlymphocytic leukemia after treatment of systemic lupus erythematosus with immunosuppressive agents, J Rheumatol, 19:92-94, 1992
84. Fereydoun G.Sajjadi 外 : Inhibition of TNF- $\alpha$  Expression by Adenosine, The Journal of Immunology, 156:3435-3442, 1996.
85. 中島泉 : 新 면역학 입문, 지구문화사, 서울, pp,256~257, 1995
86. 羅昌洙 : Rheumatoid Arthritis에서 東醫治療가 過酸化物的 活性도에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 第12卷 第2號, pp,41-51, 1991.
87. Moncada. S., Palmer, R.M.J. & Higgs, E.A.: Nitric Oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology, Pharmacol Rev, 43: 109-142, 1991
88. D.S.Bredt 外 : NITRIC OXIDE : A Physiologic Messenger Molecule, Annu. Rev.Biochem, 63:175-195, 1994.
89. 이복수 外 : 마우스 대식세포에 의해 생성되는 Nitric Oxide(NO)가 마우스 림프구의 증식에 미치는 영향, 대한 면역학회지, 第15卷 第1號, pp,69-82, 1993.
90. Stefanovic-Racic M, Stadler J., Evans CH.: Nitric oxide and arthritis, Arthritis Rheum, 36:1035-1044, 1993
91. Evans CH, Stefanovic-Racic M, Lancaster J.: Nitric oxide and its role in orthopaedic disease, Clin Orthop, 312: 275-294, 1995
92. Evans CH, Stefanovic-Racic M: Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction?, Immunomethods, 47: 107-116, 1995