

Type II Collagen으로 유발된 관절염에 대한 소경활혈탕가미의 면역 억제 효과

이중휘 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Immunity Effect of the Sogyughwalhyel-tanggami in Collagen-induced Arthritis Mice

Joong Whee Lee, Min Suck Oh*

Department of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was carried out to know the immunity responses of Sogyughwalhyel-tanggami(SGHHT) to on Rheumatoid Arthritis in Collagen-induced Arthritis(CIA) Mice. Various experimental were performed to analyse the immunity effects of SGHHT. The cytotoxicity against mFLCs was not measured. The production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α were reduced in hFLSs. The production of pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IgG3, IgG2b, IgM were reduced. Comparison of the results for this study showed that SGHHT had immunomodulatory effects of suppressing or enhancing. So we expect that SGHHT should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease. Therefore we have to survey continuously in looking for the effective substance and mechanism in the future.

Key words : Sogyughwalhyel-tanggami, Rheumatoid Arthritis, Pro-inflammatory cytokines, Collagen-induced Arthritis

서 론

류마토이드 관절염은 활액막에 만성적 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위 조직을 파괴하고, 병이 진행됨에 따라 특징적으로 관절 변형 및 강직이 유발되는 자가면역 질환으로 인구의 1~2%에서 이환되며 주로 30~50대의 여성에게 호발한다¹⁾.

한의학에서 류마토이드 관절염은 歷節風, 痛風, 白虎歷節風 등으로 표현되며²⁾, 痺證의 범주에 속하는데³⁾, 痺란 風寒濕의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱한 틈을 타고 肌肉과 經絡으로 침입하거나 關節에 凝滯됨으로써 氣血運行이 순조롭지 못하여 筋骨, 肌肉, 肢體, 關節 등에 疼痛, 酸楚, 重着, 麻木, 腫脹, 屈伸不利, 發赤 및 關節의 強直性 變形 등을 초래하는 병증이다⁴⁾.

류마토이드 관절염에 대한 연구는 많은 변화가 있어 왔는데, 점차 유발유전자나 질병약화물질의 단백질 구조가 밝혀지고

새로운 면역조절 물질이 발견되면서, 최근에는 면역학적, 유전학적인 논문들이 류마토이드 관절염 연구에 주종을 이루고 있는 실정이다⁵⁾.

Collagen-induced arthritis는 Trentham 등⁶⁾에 의해서 소개된 관절염 모델로서, 사람의 류마토이드 관절염과 임상증상, 병리조직학적 및 혈청학적으로 매우 유사함이 확인되어 류마토이드 관절염의 원인과 병태생리를 탐구하는 유용한 모델이 되어왔다.

疏經活血湯은 明代에 著述된 龔⁷⁾의 《萬病回春》에서 처음 收錄된 處方으로 順經活血行濕하는 效能이 있어 “遍身走痛如刺左足痛尤甚 晝輕夜重”⁷⁾과 “痛風血虛”⁸⁾등을 治하는데, 疏經活血湯에 대한 實驗的 研究로 金⁹⁾은 疎經活血湯合黃連解毒湯이 Adjuvant유발 關節炎에 血液學的으로 抗炎作用이 있음을 보고하였으나 疏經活血湯이 면역학적으로 류마토이드 관절염에 미치는 효과를 보고한 바는 아직 없었다.

이에 저자는 疏經活血湯加味가 류마토이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, 류마토이드 관절염 환자의 fibroblast-like synoviocytes에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생산량을 측정하였고, 혈청내 IFN- γ · IL-4 · IL-10 · IgG2b RF ·

* 교신저자 : 오민석, 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대 청주한방병원

· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3700

· 접수 : 2005/07/15 · 수정 : 2005/08/22 · 채택 : 2005/09/21

IgG3 RF · IgM RF 변화를 관찰한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 방법

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 한국생명공학연구원에서 구입한 DBA/1J mouse (SLC, Japan)과 C57bl/6 5주령을 구입하여, 온도 22±2℃, 습도 55±5%로 조정된 항온습습사육장치(대종기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(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, 한국)와 물은 자유섭취케 하였다. 하루 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 疏經活血湯加味の 처방 구성은 補血活血하는 當歸 · 生地黃 · 川芎, 清熱涼血하는 赤芍藥, 祛風濕藥인 蒼朮, 防風, 防己, 羌活, 白茯苓, 除風濕通經絡 治折傷하는 威靈仙, 鎮靜의 白芷, 祛濕熱의 龍膽草, 利氣의 陳皮, 補肝腎強筋骨의 牛膝, 活血祛瘀의 桃仁, 解表散寒하는 生薑과 藥性調和시키는 甘草, 祛風濕強筋骨하는 五加皮, 除濕熱의 黃芩, 瀉火解毒의 黃連, 清熱燥濕의 黃柏, 清熱涼血의 梔子, 通血脈의 肉桂, 清熱化痰의 牛膽南星을 加味하였다^{10,11)}. 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
五加皮	<i>Acanthopanax Cortex</i>	8
威靈仙	<i>Clematidis Radix</i>	6
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	4
桃仁	<i>Pergicae Semen</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	4
防己	<i>Stephaniae Radix</i>	4
羌活	<i>Angelicae Koreanae Radix</i>	4
防風	<i>Sileris Radix</i>	4
龍膽草	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	4
白芷	<i>Angelicae Radix</i>	4
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	3
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	3
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	3
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	3
牛膽南星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	4
Total amount		88g

3) 검액의 제조

疏經活血湯加味方 3첩 분량에 각각 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 동안 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 56g의 疏經活血湯加味 추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

(1) hFLSs에 대한 영향

Human synovial 세포(이하 hFLSs라 함)는 충남대학교 의과대학 부속병원에서 류마티오이드 관절염 환자의 synovial tissue를 공급받아 synovial membrane 조직을 차가운 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 15ml 튜브에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 튜브에 RPMI-1640에 collagenase A(5mg/ml), DNase type I(0.15mg/ml), penicillin(10⁴U/ml), streptomycin (10mg/ml), amphotericin B(25µg/ml)를 첨가한 배양 배지를 사용하여 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한 후 D-PBS로 2회 1,500rpm에서 원심분리 한 다음, 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 human synovial 세포를 분리하여 5% FBS를 첨가한 RPMI-1640에 105cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 분주하였다.

(2) mLFCs에 대한 영향

생쥐의 정상 lung fibroblast cell(이하 mLFCs라 함)은 C57bl/6 생쥐의 폐조직을 차가운 인산원충용액(D-PBS)으로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 15ml 튜브에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고, collagenase A(5mg/ml), DNase type I (0.15mg/ml), penicillin(10⁴U/ml), streptomycin(10mg/ml), amphotericin B(25µg/ml)를 첨가한 DMEM을 사용하여 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 다음 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 D-PBS로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 10% FBS를 첨가한 DMEM에 1주일 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 분리하여 5% FBS를 첨가한 DMEM에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포독성 측정

세포독성 검사는 sulforhodamine B colorimetric(SRB) assay를 변형하여 사용하였다. 정상 mLFCs는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 세포를 분리하여, 2.0×10⁴개의 세포를 96 well plate에 분주한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 이후 검액을 희석(200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)하여 각각에 20µl처리하여 용량이 200µl가 되도록 한 다음 48시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 D-PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 1% acetic acid가 함유된 0.4% SRB 용액(100µl

/well)을 가지고 실온에서 30분간 염색하고 1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조한 후 10mM tris base(100 μ l/well)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, SHKA2000, USA)에서 3.5rpm으로 5분간 혼합하고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) hFLSs에서 ELISA에 의한 cytokine 측정

hFLSs를 실험 3일전에 2차 배양(1 \times 10⁵cells/ml)하여 12 well plate에 2 \times 10⁶개 세포를 각 well에 분주한 후, 우태아혈청결핍 RPMI-1640 배양액으로 12시간 배양시켰다. 검액(100, 10, 1 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 rhIL-1 β (10U/ml), hrIL-6(100U/ml) 및 hrTNF- α (100ng/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 검액으로 처리하고 48시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하여, ELISA kit로 생산량을 측정하였다.

4) 관절염 유발 및 실험군의 분류

관절염 유발은 bovine type II collagen을 0.05M acetic acid에 2.5mg/ml의 농도로 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 교반하여 용해하고 접종 당일에 collagen 용액과 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 섞어 homogenizer(OMNI Ins., Macro ES, U.S.A.)를 이용하여 현탁액으로 만들어 쥐의 꼬리 기저부의 피하에 0.1ml 접종하였다. 21일 후에 동일한 방법으로 제조한 현탁액을 쥐의 꼬리 기저부의 피하에 0.1ml 접종하여 관절염을 유발하였다. DBA/1J 생쥐 5마리를 한 군으로 관절염을 유발시키지 않은 정상군(wild type, WT), type II collagen으로 유발시킨 후 약제를 투여하지 않은 대조군, type II collagen으로 유발시킨 후 methotrexate(MTX) 0.3mg/kg을 복강내 주사한 양성대조군 및 type II collagen으로 유발시킨 후 검액을 1일 1회씩 540mg/kg 경구 투여한 처치군으로 나누었다.

5) IL-4, IL-10, IFN- γ 및 IgG3, IgG2b, IgM의 정량화

실험을 종료한 후 ethyl ether로 마취시킨 다음, 혈청중 IL-4, IL-10, IFN- γ 및 RF인 IgG3, IgG2b, IgM의 생산량을 측정하였다. 각 well에 CIA생쥐의 혈청 100 μ l(1/100 dilution)씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader(Molecular Devices, E10514, U.S.A.)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 통계 처리

실험결과는 mean \pm standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

성 적

1. mLFCs에 대한 세포독성

세포독성을 관찰한 결과, mLFCs에서 대조군의 세포생존을

이 100 \pm 6.9(%)인데 비하여, 疏經活血湯加味 투여군 1, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/ml의 농도에서는 각각 98 \pm 4.6, 95 \pm 5.3, 92 \pm 4.4, 89 \pm 6.5, 85 \pm 7.2, 82 \pm 6.8(%)로 나타났다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on mLFCs

Drug	Dose (μ g/ml)	% of control mLFCs
Control	0	100 \pm 6.9
	1	98 \pm 4.6
	10	95 \pm 5.3
	50	92 \pm 4.4
	100	89 \pm 6.5
SGHHT	200	85 \pm 7.2
	400	82 \pm 6.8

SGHHT : Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) extract, mLFCs : Mouse lung fibroblast cells

2. IL-1 β 생산량 억제효과

ELISA kit에 의한 IL-1 β 생산량 측정에서는 정상군이 18.2 \pm 3.1(pg/ml), 대조군이 86.5 \pm 16.8(pg/ml)인데 비하여, 疏經活血湯加味 투여군 100, 10, 1 μ g/ml의 농도에서 각각 22.5 \pm 9.8, 58.4 \pm 10.5, 88.5 \pm 9.15(pg/ml)로 나타나 100 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 (p<0.01) 감소가 나타났다(Table 3).

Table 3. Inhibitory Effect of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on the IL-1 β Production in Pro-inflammatory Cytokine Stimulated-hFLSs

Treatment group	Dose	IL-1 β Production (pg/ml)	
RPMI1640-Media	0	18.2 \pm 3.1	
rhIL-1 β plus rhTNF- α	Control	86.5 \pm 16.8	
	SGHHT	22.5 \pm 9.8**	
	(μ g/ml)	10	58.4 \pm 10.5
	1	88.5 \pm 9.15	

RPMI-1640 media control was not treated (NC), rIL-1 β (100U/ml) plus TNF- α was control(CT), rIL-1 β (100U/ml) plus TNF- α + SGHHT(100, 10, 1mg/ml). Statistically significant value compared with control group by T test (* : p<0.05, ** : p<0.01).

3. IL-6 생산량에 미치는 영향

ELISA kit에 의한 IL-6 생산량 측정에서는 정상군이 896 \pm 58.1(pg/ml), 대조군이 3456 \pm 406.2(pg/ml)인데 비하여, 疏經活血湯加味 투여군 100, 10, 1 μ g/ml의 농도에서 각각 1026 \pm 98.2, 1895 \pm 102.6, 3089 \pm 124.5(pg/ml)로 나타나 10 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있는(p<0.001) 감소가 나타났다(Table 4).

Table 4. Inhibitory Effect of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on the IL-6 Production in Pro-inflammatory Cytokine Stimulated-hFLSs

Treatment group	Dose	IL-6 Production (pg/ml)	
RPMI 1640-Media	0	896 \pm 58.1	
rhIL-6 plus rhTNF- α	Control	3456 \pm 406.2	
	SGHHT	1026 \pm 98.2***	
	(μ g/ml)	10	1895 \pm 102.6**
	1	3089 \pm 124.5	

RPMI-1640 media control was not treated(NC), rIL-6(100U/ml) plus TNF- α was control(CT), rIL-6(100U/ml) plus TNF- α + SGHHT(100, 10, 1mg/ml). Statistically significant value compared with control group by T test (* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

4. TNF-α 생산량에 미치는 영향

ELISA kit에 의한 TNF-α 생산량 측정에서는 정상군이 530±43.1(pg/ml), 대조군이 1768±203.5(pg/ml)인데 비하여, 疏經活血湯加味 투여군 100, 10, 1μg/ml의 농도에서 각각 1101±102.6, 1324±101.1, 1522±132.7(pg/ml)로 나타나 10μg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 감소가 나타났다(Table 5).

Table 5. Inhibitory Effect of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on the TNF-α Production in Pro-inflammatory Cytokine Stimulated-hFLSs

Treatment group	Dose	TNF-α Production(pg/ml)
RPMI1640-Media	0	530 ± 43.1
rhIL-1β plus rhTNF-α	Control	1768 ± 203.5
	SGHHT 100	1020 ± 86.4**
	SGHHT 10	1248 ± 94.6*
	SGHHT 1	1522 ± 132.7

RPMI-1640 media control was not treated(NT), rIL-1β(100U/ml) plus TNF-α was control(CT), rIL-1β(100U/ml) plus TNF-α + SGHHT(100, 10, 1mg/ml). Statistically significant value compared with control group by T test (* : p<0.05, ** : p<0.01).

5. 혈청내의 IFN-γ에 미치는 영향

IFN-γ에서는 정상군 75±0.41(pg/ml), 대조군 36.9±2.51(pg/ml), 양성 대조군 10.4±6.75(pg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는 13.6±7.2(pg/ml)로 유의성 있는 (p<0.05) 감소 효과가 나타났다(Fig. 1).

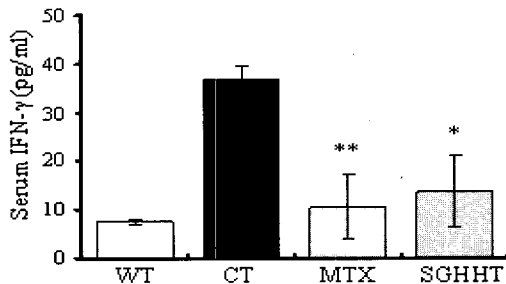


Fig. 1. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on IFN-γ level in the serum of CIA mice. IFN-γ concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA- SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IFN-γ concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

6. 혈청내의 IL-4에 미치는 영향

IL-4에서는 정상군 6.5±1.5(pg/ml), 대조군 10.5±2.02(pg/ml), 양성 대조군 8.9 ±1.67(pg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는 28±4.2(pg/ml)로 (p<0.01) 증가 되었다(Fig. 2).

7. 혈청내의 IL-10에 미치는 영향

IL-10에서는 정상군 20.3±4.8(pg/ml), 대조군 64±10.2(pg/ml), 양성 대조군 22.3±5.2(pg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는 110.4±16.8(pg/ml)로 (p<0.05) 증가 되었다(Fig. 3).

8. 혈청내의 IgG2b RF에 미치는 영향

IgG2b RF에서는 정상군 2.2±0.5(mg/ml), 대조군 12.0±2.8(mg/

ml), 양성 대조군 4.3±1.6(mg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는 5.3±1.46(mg/ml)로 유의성 있는 (p<0.05) 감소 효과가 나타났다 (Fig. 4).

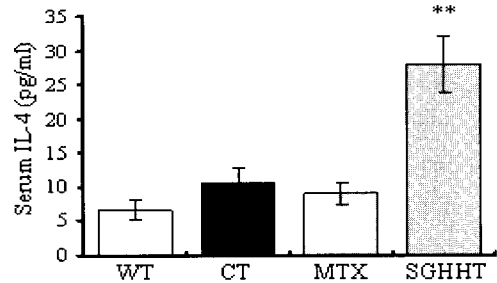


Fig. 2. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on IL-4 level in the serum of CIA mice. IL-4 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA- SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IL-4 concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

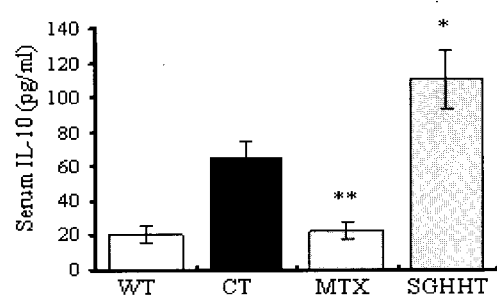


Fig. 3. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on IL-10 level in the serum of CIA mice. IL-10 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA- SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IL-10 concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

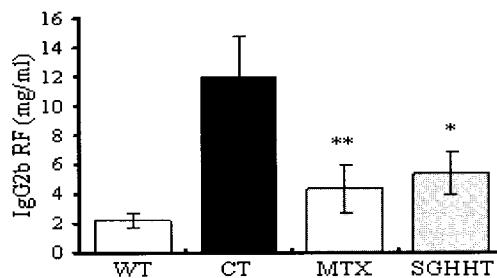


Fig. 4. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on immunoglobulin G2b in the serum rheumatoid factor(RF) of CIA mice. IgG2b concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA- SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IgG2b concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

9. 혈청내의 IgG3 RF에 미치는 영향

IgG3 RF에서는 정상군 1.2±0.4(mg/ml), 대조군 7.6±1.6(mg/ml), 양성 대조군 3.1±0.8(mg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는

4±0.9(mg/ml)로 유의성 있는 (p<0.05) 감소 효과가 나타났다(Fig. 5).

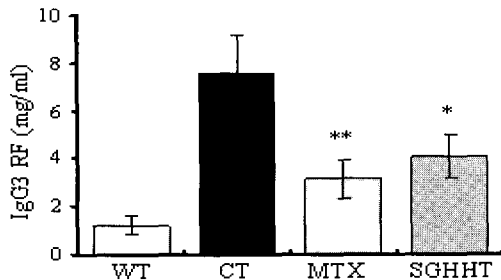


Fig. 5. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on immunoglobulin G3 in the serum rheumatoid factor(RF) of CIA mice. IgG3 concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA-SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IgG3 concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

10. 혈청내의 IgM RF에 미치는 영향

IgM RF에서는 정상군 1.8±0.08(mg/ml), 대조군 9.1±1.4(mg/ml), 양성 대조군 5.7±0.9(mg/ml), 疏經活血湯加味 투여군에서는 4.6±1.3(mg/ml)로 유의성 있는 (p<0.05) 감소 효과가 나타났다(Fig. 6).

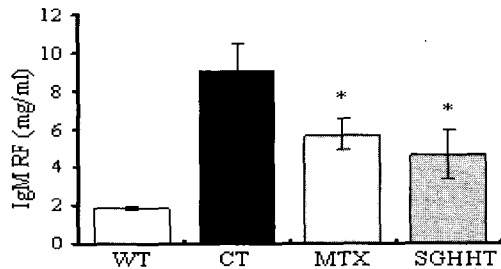


Fig. 6. Effects of Sogyunghwalhyel-tanggami(SGHHT) on immunoglobulin M in the serum rheumatoid factor(RF) of CIA mice. IgM concentration levels in serum of CIA mice. WT : Normal DBA/1j mice CT : Collagen-induction Arthritis (control) MTX : CIA + Methotrexate (0.3mg/kg) CIA-SGHHT: CIA + SGHHT (540mg/kg) Data are the mean serum IgM concentration levels (picograms per milliliter)±SE (n=5) in each group. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

고찰

류마토이드 관절염은 관절내의 활막의 증식, 단핵구 세포의 침윤, 신생혈관 형성 등의 병적 현상들이 상호작용하여 활막조직의 항상성이 파괴되어 발생하는 만성 염증성 자가면역질환이다¹²⁾. 류마토이드 관절염의 임상적 특징은 관절이나 건의 활액에 비세균성 만성염증반응이 장기간 나타나면서 관절통이나 종창이 악화과 호전을 반복하며, 초기에는 활액막이 증식하고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하며 장기간 진행되면 관절의 연골과 관절주위 조직이 파괴되어 관절의 강직이나 변형이 지속될 수 있다¹³⁾.

류마토이드 관절염은 韓醫學의으로 痺症, 歷節風, 痛風, 白虎風, 鶴膝風, 風痺, 類風濕性關節炎 등의 병증에 속한다고 볼 수

있으며⁴⁾, 그 중에서도 가장 포괄적이고 제반운동, 감각장애를 총칭하는 痺症을 중심으로 痛風, 歷節風, 類風濕性關節炎 등과 연계하고 있다.

따라서 韓醫學分野에서는 韓藥을 이용하여 류마토이드 관절염에 대한 實驗的 研究가 활발히 진행되고 있는데, 複合處方으로는 血府逐瘀湯¹⁴⁾, 防風湯¹⁵⁾ 등이 있다. 이러한 研究 動向들은 초기의 단순한 血液學的, 血清學的, 肉眼的 所見을 비교하는데서 탈피하여 점차 免疫學的 效能을 검증하려는 경향을 보이고 있다. 疏經活血湯은 四肢歷節遊走痺痛을 치료하는 처방으로 四物湯(白芍藥·當歸·生地黃·川芎)의 補血活血에 祛風濕藥인 蒼朮, 防風, 防己, 羌活, 白茯苓과, 除風濕通經絡 治折傷하는 威靈仙을 配劑하여 氣行血行을 원활하게 하여 通則不痛을 꾀하고, 白芷의 鎮靜과 龍膽草의 祛濕熱(消炎)작용, 그리고 利氣의 陳皮, 補肝腎強筋骨의 牛膝, 活血祛瘀의 桃仁, 解表散寒하는 生薑과 甘草의 藥性調和로 구성되어 있어 祛風濕 補血 活血化痰 治風濕痺痛 歷節疼痛하는 효능이 있다¹⁶⁾.

Collagen은 인체 내에서 가장 풍부한 단백질로 동물의 진화과정 중 주위환경의 영향과 기능적 요구에 따라 경직성, 탄성 및 강도가 서로 다른 일련의 단백질이 발달한 것을 말하며 주로 피부, 골, 연골, 평활근 및 기저판 등에 존재한다. 그리고 인간을 비롯한 척추동물의 체내 단백질 건조중량의 30%를 차지하고 있으며 12종류 이상이 알려져 있으나 가장 흔하고 연구가 많이 되어 있는 것이 type I · II · III · IV · V인데, 그 중 type II collagen은 연골조직에 국한되어 주로 연골과 탄력연골에 존재하며, 관절연골 교원질의 90% 이상을 차지하여 연골파괴의 표식자로 이용되고 있다¹⁶⁾.

관절염유발을 위해 collagen을 처음 사용한 것은 Trentham에 의해서인데¹⁷⁾, Trentham등⁶⁾은 실험동물에서 type II collagen을 피하 주사하여 류마토이드 관절염과 유사한 다발성 염증성 관절염을 유발시킴으로써 type II collagen과 류마토이드 관절염과의 관련성에 대해 보고하였고, 이후 type II collagen에 반응하는 T세포 및 B세포가 류마토이드 관절염 환자의 말초 혈액과 활액 내에 존재하며¹⁸⁾ type II collagen에 대한 자가 항체가 환자의 혈청, 활액, 연골 등에서 흔히 발견되므로써¹⁹⁾ 류마토이드 관절염의 발생 혹은 악화에 type II collagen에 대한 비정상적인 면역반응이 관여함을 시사하게 되었다. 또한 실험동물에 대한 type II collagen 접종에 의해 류마토이드 관절염과 유사한 염증성 관절염이 유발 된다고 보고 되었고¹⁸⁾, 실제 류마토이드 관절염환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되고, 질병의 진행에도 관련된다고 보고되고 있으며 type II collagen 유발 관절염모델이 면역학적, 조직학적, 임상적으로 사람의 류마토이드 관절염과 매우 유사함이 확인되어 90년대경 부터 류마토이드 관절염과 관련된 한의학연구의 실험모델로 널리 이용되고 있다²⁰⁾.

류마토이드 관절염의 원인과 병태생리에 대하여 아직은 명확한 결론이 없고, 현재까지 제기된 병인적 가설은 감염설, 비타민 결핍, 호르몬의 부조화 및 면역학적 인체반응 등이 있지만, 자가항체들의 출현을 위시한 다양한 변화들로 이루어 보아 자가면역반응설이 가장 유력하다^{1,21)}.

류마티오이드 관절염의 발생에 있어 세포성 면역반응은 주로 T림프구에 의하여 이루어지나, NK세포와 대식세포들에 의해 이루어지기도 하며, 이들 세포간에는 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다²²⁾.

주로 혈관변화, 부종 및 호중구의 침윤을 동반하는 급성 염증과는 대조적으로 만성 염증의 가장 중요한 특징적 소견은 대식세포 림프구 및 형질세포의 침윤, 섬유모세포와 소혈관의 증식, 섬유화 및 조직의 파괴 등이다¹³⁾. 만성 염증성 질환의 하나인 류마티오이드 관절염에서도 활액막에 활액세포가 증식하고, 많은 림프구와 어느 정도의 형질세포 그리고 대식세포가 침윤된다¹⁾. 가장 많이 침착하는 세포는 T림프구이다¹²⁾. IL-1은 단핵구, 대식세포, B세포, 활성화된 T세포에서 생성되고, IL-1 α , IL-1 β 의 두가지 형태가 있으며¹²⁾, IL-1 β 는 류마티오이드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증진시키고²³⁾, 호중구, 림프구, 단핵세포의 침윤을 유발하며²⁴⁾, ICAM-1의 발현을 촉진하여 내피세포에 대한 백혈구의 유착성을 증가시키고²⁵⁾, 섬유모세포, 활액막세포 및 연골세포에서 PGE₂ 와 collagenase 생산을 촉진하여 관절연골의 파괴와 골의 재흡수를 초래한다^{24,25)}. 또한 preosteoclast를 유도하여 osteoclast의 생성을 촉진시킨다^{26,27)}.

IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는²⁸⁾, 급성 조절 단백질로서 류마티오이드 관절염의 염증반응에 주된 매개 작용으로 혈청 및 관절액의 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가하며, 골관절염보다 높은 활성도를 보여 류마티오이드 관절염의 활성도와 연관성이 있다^{29,30,31,32)}. 또한 Katherine³³⁾ 등은 IL-6이 활액막이나 관절조직의 혈관에서 분비되어 혈청에서보다 관절액에서 더 높은 활성도를 보인다고 한 것으로 보아서^{30,33,34)}, IL-6가 류마티오이드 관절염에서 면역반응의 매개체로서 병리생리에 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

TNF- α 는 IL-1 β 와 마찬가지로 주로 대식세포에서 분비되고, 류마티오이드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, 호중구, 림프구, 단핵구의 화학유주 및 섬유모세포증식 활막섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE₂와 collagenase 생산을 촉진한다³³⁾.

疏經活血湯加味가 류마티오이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, Type II collagen으로 유발된 CIA 생쥐를 대상으로, ELISA kit을 이용하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생산량을 측정하였으며, 혈청내 IFN- γ · IL-4 · IL-10 · IgG2b R F · IgG3 R F · IgM R F에 미치는 영향을 측정하였다.

본 실험에서 실험군의 疏經活血湯加味 추출물의 mLFCs에 대한 세포독성은 1, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/ml 처리군에서 82 \pm 6.8% 이상의 생존률로 mLFCs에 대한 疏經活血湯加味の 독성이 나타나지 않았다(Table 2).

본 실험에서 疏經活血湯加味가 ELISA kit에 의한 hFLSs의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생산량에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군에 비하여 실험군은 유의성 있는 감소가 나타났다(Table 3-5).

류마티오이드 관절염환자의 혈액 및 활액막 조직의 80%정도에서 발견되는 류마티오이드인자(rheumatoid factor, RF)들은 항체의 기능을 가지고 있는 항글로불린, 즉 IgG(immunoglobulin G)의 Fc부위에 대한 자가 항체로 생각되며, B 림프구에서 생성된

다. 여러 가지 동종형이 있는데 이중 IgM은 질환의 심한 정도 및 특히 피하결절 등 관절의 증상의 정도와 연관되어진다. 류마티오이드 인자가 류마티오이드 관절염과 강한 연관성을 보이니, 명백하게 병의 원인이라고 말할 수는 없다¹⁾.

B림프구는 활성 T세포에 의하여 본격적으로 세포분열과 형질세포로 분화하여³¹⁾ IgG항체를 생산하고, 이 IgG가 다시 항원으로 작용하여 IgG의 항체인 RF를 생산한다. RF는 활액막에서 IgG와 응집물을 형성하면 보체를 활성화시키는 화학 매개물이 방출되고 활액 세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활액세포 파괴와 염증반응을 일으킨다¹⁾.

본 실험에서 실험생쥐의 IFN- γ , IL-4, IL-10 그리고 RF인 IgG3, IgG2b와 IgM 혈청측정을 하기위해 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)로 생산량을 측정된 결과 정상군, 대조군, 양성대조군과 비교하여 실험군이 유의성있는 감소효과를 나타내었다(Fig. 1-6).

이상의 결과를 총괄해보면, 疏經活血湯加味가 Type II collagen으로 유발된 CIA 생쥐를 대상으로한 연구결과에서 mLFCs에 대한 세포독성 실험에서는 세포독성은 나타나지 않았고, hFLSs의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생산량이 억제되었으며, 실험생쥐의 혈청내 IFN- γ · IL-4 · IL-10 · IgG2b R F · IgG3 R F · IgM R F도 억제되는 바, 류마티오이드 관절염에 유의함을 알 수 있고 향후 임상에서의 활용이 기대된다.

결론

疏經活血湯加味가 Type II collagen으로 유발된 CIA 생쥐에 대한 면역반응을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

세포독성은 mLFCs에서 82 \pm 6.8% 이상의 생존률을 나타내었다. hFLSs의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생산량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 혈청 중 IFN- γ , IgG3, IgG2b, IgM의 생산량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이상의 결과로 보아 疏經活血湯加味가 collagen 유발 관절염에 형태학적 뿐만 아니라 면역학적으로도 효과가 있음을 알 수 있으며 임상적으로 류마티오이드 관절염에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 제5판. 서울, 최신의학사. pp 109-131, 157-174, 176, 2000.
2. 李 榭. 編註醫學入門. 서울. 大星文化社. 523, pp 369-371, 1989.
3. 權宰植 외. 痺證. 서울:鼎談. pp 207-208, 214-215, 219-222, 270, 1993.
4. 全國韓醫科大學再活醫學教室. 東醫再活醫學科學. 서울, 書苑堂. pp 95-114, 1995.
5. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논문의 경향. 대한침구학회지. 19(5):190-194, 2002.
6. Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H. Autoimmunity to type II collagen. An experimental model of arthritis. J. Exp.

- Med. 146:857-868, 1977.
7. 龔廷賢. 萬病回春. 서울, 杏林書院. pp 53-56, 1972.
 8. 周命新. 醫門寶鑑. 서울, 杏林書院. 38, 225, 1977.
 9. 金苟中. Adjuvant關節炎에 疎經活血湯合黃連解毒湯이 미치는 實驗的 研究. 大田大學校大學院, 1992.
 10. 康舜洙 著. 바른 方劑學. 서울, 大星文化社. pp 192-193, 1996.
 11. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울. 永林社. p 47, 137, 167, 178, 180, 182, 195, 283, 336, 451, 1995.
 12. 해리슨 면역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울, 도서출판정당. pp 179, 1783, 1779-1785, 1997.
 13. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사. pp 85, 1672, 1166-1170, 1997.
 14. 諸正鎭. 血府逐瘀湯이 Adjuvant誘發 關節炎에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1993.
 15. 申敏湜. 防風湯이 Adjuvant 誘發 關節炎에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1994.
 16. 洪桂敏. 蠲痺 I II 治療類風濕性關節炎100例. 遼寧中醫雜誌. 26(3):18, 1999.
 17. 박동준 외. 흰쥐에서 제 II형 collagen유발 관절염의 임상양상 및 면역 반응. 카톨릭대의학부논문집. 43(2):451-468, 1990.
 18. Londei, M., Savil, C.M., Verhoef, A., Brennan, F., Leech, ZA, Duance, V. et. al. Persistence of collagen type II specific T-cell clones in synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A. 86:636-640, 1989.
 19. Terato, K., DeArme, D.A., Ye, X.Y., Griffiths, M.M., Cremer, M.A. The mechanism of autoantibody formation to cartilage in rheumatoid arthritis : Possible cross-reaction of antibodies to dietary collagens with autologous ype II collagen. Clin. Immunol. Immunopathol. 79:142-152, 1997.
 20. 申炳熙. 桂枝芍藥知母湯이 第 II型 Collagen誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1994.
 21. 김동집, 박동준. 류마토이드 관절염의 병인. 대한류마토이드 학회지. 1:1-12, 1994.
 22. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학 강의. 대구:경북대학교출판부. pp 10, 22, 25, 77, 193, 200, 215, 235, 248, 357, 211-212, 232-235, 1996.
 23. 전재범. 류마토이드 관절염 환자의 활액막 세포와 T세포의 유착에서 ICAM-1의 역할. 대한류마토이드학회지. 2(2):119-125, 1995.
 24. Seitz, M., Loetscher, P., Dewald, B., Towbin, H., Ceska, M., Bagioni, M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chematactic protein, and prostaglantin E by rheumatoid and osteoarthritis. synoviocytes regulation by IFN- γ and IL-4, J. Immunol. 17(20):2060-2065, 1993.
 25. Matsukawa, A., Ohkawara, S., Maeda, T., Takagi K., Yoshinaga, M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysac-charide- induced arthritis in rabbits. Clin. Exp. Immunol. 93(2):206-211, 1993.
 26. 오상근, 윤태현. 류마토이드성 관절염에 대한 조직학적 연구. 대한정형외과학회지. 16(3):528-538, 1981.
 27. Kelli, P.A. Resistance of Rheumatoid Synovial Dendritic Cells to the Immunosuppressive Effects of IL-10. J. Immunol. 163:5599-5607, 1999.
 28. Simi, T. Inhibition of IL-6, IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. J. Immunol. 165:5227-5237, 2000.
 29. Okumoto, H., Matsuda, T., Turner, M. The synovial expression and serum level of IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor and oncostain in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism. 40:1096-1105, 1997.
 30. Jacqueline Uson, Alejiandro Balsa, Dorsa Pascual-Salcedo. Soluble IL-6 Receptor and IL-6 Levels in Serum and synovial fluid of patient with differant Arthropathies. J. Rheumatol. 24:2069-2075, 1997.
 31. Frederic, A. Houssian Jean-Pierre Devogelaer, Jo van Damme. IL-6 synovial fluid and serum of patient with Reumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis and Rheumatism. 31:783-788, 1988.
 32. Anders Waage, Cecile Kaufmann, Terije Espevik, Gunnar Husby. IL-6 in synovial fluid Patient with Arthritis. Clinical Immunology and Immunopathology. 50:394-398, 1989.
 33. Maarten Helle, Leonie Boeije, Els de Groot, Alex devos, Lucian Araden. Sensitive ELISA for IL-6 detection of IL-6 in biological synovial fluid and serum, Journal of Immunological Methods. 138:47-56, 1991.
 34. Katherine, L., Manson Terry L., Moore James M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with Juvenile Rheumatoid Arthritis. J. Rheumatol. 21:2359-2363, 1994.