Collagen II로 유도된 CIA 관절염 생쥐의 대한 加味海桐皮散의 억제 효과

김남욱 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실

Suppressive Effects of GHS in Knee Joint, Regional Lymph Nodes, and Spleen on Collagen-induced Arthritis in Mice

Nam Woog Kim, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease with chronic inflammation characterized by hyperplasia of synovial cells in affected joints, which might be mediated by the altered activation of Immune system, ultimately leading to the destruction of cartilage and bone. To examine effects of GHS on rheumatoid arthritis DBA/1J mice were immunized with bovine type II collagen to induced arthritis and then treated with GHS once a day for 7 weeks. Oral administration of GHS (200 mg/Kg) significantly suppressed the progression of CIA, which extend is comparable to that of methotrexate (MTX, 0.3 mg/Kg), a positive control. The severity of arthritis within the knee joints, which was evaluated by histological assessment of cartilage destruction and pannus formation, was also lowered by GHS. The production of TNF-and IL-6 in serum was significantly suppressed. The levels of IFN-g in the culture supernatant of splenocytes stimulated with CD3/CD28 or collagen were dramatically decreased, while those of IL-4 was increased. The levels of IgG and IgM RA factor were also decreased in the serum. FACS analysis indicated that B cells (in DLN), CD3+ T cells (in spleen, and paw joint), CD11b+Gr-1+ cells (in paw joint), CD3+CD49b(DX5) (in PBMC) were decreased and there was increased proportion of CD3+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+ T cells in DLN. In conclusion, our results demonstrates that GHS significantly suppressed the progression of CIA and this action was characterized by the decreased production of TNF-a, IL-6, and rheumatoid factors, and modulations of immune cell populations.

Key words : GHS, Rheumatoid arthritis, DBA/1J mice, Type II collagen, Cytokine, Immune cells

서 론

류마티스관절염은 염증세포의 침윤과 활막의 현저한 이상증식 (hyperplasia)으로 뼈와 관절이 파괴되는 만성 염증성 질환이며, 류마티스 인자와 같은 자가항체 생성 등을 특징으로 하는 전신적인 자가 면역질환이다[1]. 많은 연구에도 불구하고 아직 그 원인이 정확하게 규명되지 못하고 있으며, 인종에 따라 차이는 있지만 인구의 1% 정도가 이 질환으로 기능 장애를 겪고 있다고 알려져 있다.

류마티스관절염의 병리 기전에는 염증성 사이토카인, tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 interleukin-1β (IL-1β)와 밀접한 연관이 있으며, 또한 Th1 세포/Th2 세포의 불균형, 그리고 항원 특이적 항체의 과잉 생성 등이 연관되어 있는 것으로 보고되어 있다[2-4]. 따라서 이에 대한 치료제 개발은 면역학적 조절과 부작용에 초점이 맞추어져 있으며, 최근에는 유전공학적 연구를 통하여 다양한 치료제들이 개발 중에 있다.

그러나 최근 사용되기 시작한 항류마티스 제제의 일종인 생물학 제제는 가격이 비싸 비용적인 측면에서 효과적이지 못하며, 면역 체계의 변화로 감염 및 약물 과민 반응을 일으킬 위험이 높은 것으로 보고되어 있다[5]. 또한 장기 복용으로 인한 설사와 간독성 같은 부작용이 제기되고 있다.

이러한 임상적인 문제로 인하여 효과적인 신물질의 개발이 지속적으로 요구되고 있으며, 특히 한약을 포함한 생약으로부터

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
· E-mail : djkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2007/09/29 · 채택 : 2007/10/12

신약을 창출하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

한의학에서 류마티스관절염은 타 관절염과 동일하게 '痺證'과 '歷節'의 범주에 든다[6-10]. 《素問 · 痺論》[11]에서 "風寒濕三氣雜至 合而爲痺 其風勝者行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲着痺也"라고 하여 風寒濕이 주 병인임을 언급하면서 邪氣의 偏勝을 기준으로 痺證을 3가지로 구별하였다. 이 밖에 청대 王淸任의 《醫林改錯》에서는 瘀血이 비병의 주 병인을 언급하였으며, 섭천사는 '痺久不癒者'에 대하여 '久病入絡'설을 언급하기도 하였다[12]. 따라서 辨證에 있어서도 風重型, 濕重型, 寒重型을 중심으로 化熱型, 錯雜型 등으로 나누어 다양한 치료법이 활용되고 있다[6-10].

최근 이에 대한 연구로 오 등[13]은 "류마치스관절염의 한양방적 약물 치료에 대한 최신 경향"의 문헌적 연구를 보고한 바가 있고, 서 등[14,15]은 鷄血藤, 豨簽 등을 단일 약재를 시료로 이들의 항류마치스 작용을 규명하였으며, 황 등[16]은 약침의 항류마치스 작용에 대한 임상적 연구를 보고한 바가 있다.

본 시료인 加味海桐皮散은 강[17]의 海桐皮散에 忍冬藤을 가한 처방으로 祛風利濕 活血止痛 효능이 있는 약물로 구성되어 있다. 특히 가미된 忍冬藤은 이미 실험적으로 면역조절작용[18,19]과 진통 · 소염작용[20]이 규명된 바가 있어 보다 유의성있는 결과가 기대된다.

이에 저자는 加味海桐皮散이 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, DBA/1J 생쥐에 collagen II를 감작하여 관절염을 유도한 후 加味海桐皮散을 투여하여 항관절염 효과를 검색하고, 양성대조군으로 MTX를 사용하여 효능을 비교하였던 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

본 실험에 사용한 加味海桐皮散 (GHS)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩 (貼)의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH_4Cl, $KHCO_3$, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, TMB, antibody biotin- conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-carboxyme thoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim (MTS), 2,7-dichloro-dihydrofluorescindiacettate (DCFH -DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사 (Madison, U.S.A) 제품을, IL-4와 IFN-γ는 ELISA kit (Boosourse., U.S.A), antibody Avidin-HRP conjugeted (R&D system, U.S.A), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMED은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 재조합 TNF-a와 IL-1β는 R&D system 사 (Minneapolis, U.S.A) 제품을, PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC- anti-CD8, PE-anti- CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b는 Pharmingen 사 (Torreyana, Iraq) 제품을, anti -CD28, anti-CD3은 Serotec사 (Oxford. U.K) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), real time quantitative RT-PCR (Applied Biosystems, Co., U.S.A.), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), spectrophotometer (Shimazue. Japan), centrifuge (Centrikon, Sigma), bio-freezer (Sanyo, Japan), primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), turbo thermal-cycler TM (Bioneer Co., Korea), heating block, ice-maker (Vision, Korea), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001, Korea), vaccum pump, rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDu-540, Japan), autoclave (Hirayama, Japan), imager system (Kodak, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A), ELISA reader (Molecular devices, U.S.A), 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass. U.S.A) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등을 사용하였다.

Table 1. The Composition of Gamihaedongpi-san(GHS)

韓藥名	生 藥 名	(g)
海桐皮	*Erythrinae Cortex*	15
牛 膝	*Achyranthis Bidentatae Radix*	7.5
防 風	*Ledebouriellae Radix*	7.5
獨 活	*Angelicae Pubescentis Radix*	7.5
續 斷	*Dipsaci Radix*	7.5
仙靈脾	*Epimedii Herba*	7.5
五加皮	*Acanthopanacis Cortex*	7.5
赤芍藥	*Paeonia Radix Rubra*	7.5
草 薢	*Dioscoreae Tokoro Rhizoma*	7.5
細 辛	*Asari Herba Cum Radice*	7.5
豨 薟	*Siegesbeckiae Herba*	10
鷄血藤	*Spatholobi Caulis*	10
玄胡索	*Corydalidis Tuber*	5
忍冬藤	*Lonicerae Caulis*	10
	Total amount	117.5

2. 방법

1) 시료 추출

GHS 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-114, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 후(20.4 g), 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 류마티스 관절염 생쥐 (CIA) 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine typeⅡ collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 ㎍를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/1J 생쥐 6마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate (0.3 mg/kg) 처리한 양성대조군과 GHS 투여군으로 나누었다.

3) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 6 마리씩을 한 군으로 하여 정상군 (WT), 치료제를 처리하지 않은 대조군(Control-CT), 그리고 methotrexate (0.3 mg/kg) 처리군, GHS 처리군으로 나누어 booster 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)를 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 복강에 주사하였으며, GHS (200 mg/kg) 처리군은 7주 동안 매일 오전 11시에 경구 투여하였다.

4) Arthritis index (AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준[21]에 따라 발병율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도(표)를 1 주일에 1회씩 7주간 기록하였다.

단계	유 발 정 도
0	No arthritis
1	Small degree of arthritis
2	Light swelling
3	Medium swelling
4	Severe swelling

5) Spleen, draining lymph node (DLN), paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 spleen, draining lymph node (DLN) 및 paw joint를 적출하였다. 이를 100 mesh로 세포를 분리한 후 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 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℃ shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (Absolute number)를 산출하였다.

6) 형광 유세포 분석

총세포수 측정에서 나타난 바와 같이, 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC- anti-CD69, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 spleen, draining lymph node (DLN), paw joint에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

PBMC(peripheral blood mononeucleo cell)는 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g NH_4Cl, 1 g $KHCO_3$, in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D- PBS로 2회 세척하였다. 이를 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정한 PBMC 세포를 5 x 10^5/ml 세포로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석하였다.

7) 비장세포내 IL-4, IFN-γ 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (2 x 10^6/mL)를 anti-CD28 (1 μg/mL) (Serotec. U.S.A)와 anti-CD3 (1 μg/mL) (Serotec. U.S.A) 항체, 그리고 collagen type II (1 μg /mL)로 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass. U.S.A)에서 coating 된 plate에서 48시간 동안 동시배양 하였다. 비장내 IL-4와 IFN-γ는 ELISA kit (R&D system, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 비장세포 배양 상층액 100 ㎕씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugeted (R&D system, U.S.A) 100 ㎕를 처리하고, 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 혈청내 사이토카인 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF-α 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugeted 100 ㎕를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 ㎕의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno -sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4℃ 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugeted 100 ㎕를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 관절염 유발율에 미치는 영향

관절염 유발율을 매주 한번씩 7주 동안 검사한 결과, 1-2주 동안 약물을 처리한 모든 실험군의 관절염 지수가 대조군과 비슷한 양상으로 증가하였으나, 3주부터 MTX 투여군과 GHS 투여군의 관절염 지수가 점차 감소함을 보였고, 5주 이후부터는 MTX 투여군과 GHS 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1).

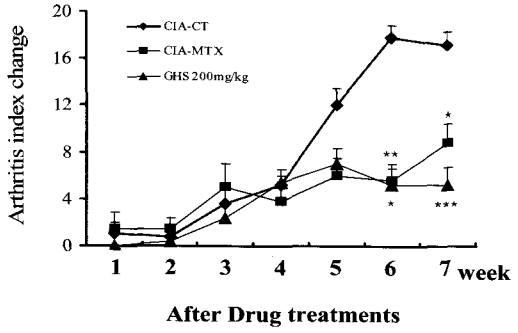

Fig. 1. Suppressive effect of GHS on arthritis index of paw paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into three groups and each group was treated with DW (CIA-CT), GHS (CIA-GHS : 200 mg/kg) or MTX (CIA-MTX : 0.3 mg/kg) in a daily base. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

2. Spleen, DLN 및 paw joint의 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 8주간 GHS를 경구 투여한 후 spleen, DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, spleen에서는 정상군이 9.10 ± 1.10 (x10^7), 대조군이 17.20 ± 1.00 (x10^7), MTX 투여군이 15.20 ± 1.80 (x10^7), GHS 200 mg/kg 투여군이 8.20 ± 2.20 (x10^7)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

DLN에서는 정상군이 43.80 ± 18.60 (x10^6), 대조군이 7.56 ± 3.24 (x10^6), MTX 투여군이 54.30 ± 3.61 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 19.50 ± 1.70 (x106)로 나타나, 이 역시 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다(Fig. 2).

Paw joint에서는 정상군이 30.3 ± 1.20 (x10^6), 대조군이 114.0 ± 1.8 (x10^6), MTX 투여군이 69.70 ± 4.9 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 57.75 ± 8.9 (x10^6)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

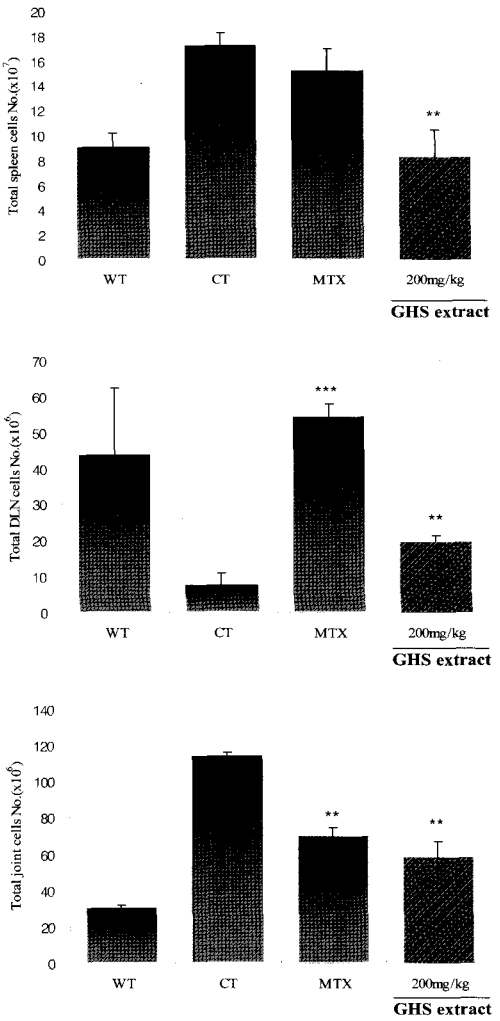

Fig. 2. Effect of GHS on total cell number of spleen, DLN and paw joint in CIA mice. WT(Normal), CT (Control), MTX (0.3 mg/kg) GHS (200 mg/kg). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. 면역세포에 미치는 영향

1) 비장내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD19+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 43.2 ± 8.9 (x10^6), 대조군이 118.4 ± 5.9 (x10^6), MTX 투여군이 81.4 ± 8.9 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 49.6 ± 5.9 (x10^6)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01, ***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

(2) CD3+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD3+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정

상군이 37.4 ± 2.9 (x10^6), 대조군이 44.2 ± 2.2 (x10^6), MTX 투여군이 52.9 ± 3.1 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 26.2 ± 2.7 (x10^6)로 나타났다(Table 2).

(3) CD3+/CD69+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD3+/CD69+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 4.5 ± 0.0 (x10^6), 대조군이 23.5 ± 1.5 (x10^6), MTX 투여군이 4.7 ± 1.3 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 5.7 ± 1.6 (x10^6)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (***$p<0.001$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

(4) CD4+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD4+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 20.5 ±2.4 (x10^6), 대조군이 21.8 ± 4.4 (x10^6), MTX 투여군이 30.6 ± 3.1 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 15.8 ± 3.1 (x10^6)로 나타났다(Table 2).

(5) CD8+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD8+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 1.6 ± 0.3 (x10^6), 대조군이 2.2 ± 0.3 (x10^6), MTX 투여군이 2.2 ± 0.2 (x10^6), GHS 200 mg/kg 투여군이 1.4 ± 0.0 (x10^6)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (**$p<0.01$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Effects of GHS on Absolute Number of Cells in Spleen of CIA Mice

	WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
CD19+(x10^6)	43.2 ± 8.9	118.4 ± 5.9	81.4 ± 8.9***	49.6 ± 5.9***
CD3+ (x10^6)	37.4 ± 2.9	44.2 ± 2.2	52.9 ± 3.1	26.2 ± 2.7
CD3+/CD69+(x10^6)	4.5 ± 0.0	23.5 ± 1.5	4.7 ± 1.3***	5.7 ± 1.6***
CD4+ (x10^6)	20.5 ±2.4	21.8 ± 4.4	30.6 ± 3.1	15.8 ± 3.1
CD8+ (x10^6)	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.0**

2) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD19+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 105.3 ± 3.2 (x10^4), 대조군이 35.3 ± 1.5 (x10^4), MTX 투여군이 102.0 ± 6.7 (x10^4), GHS 200 mg/kg 투여군이 56.3 ± 4.5 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (**$p<0.01$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 3).

(2) CD3+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD3+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 311.5 ± 4.7 (x10^4), 대조군이 36.6 ± 5.1 (x10^4), MTX 투여군이 407.2 ± 2.1 (x10^4), GHS 200 mg/kg 투여군이 127.8 ± 6.6 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (***$p<0.001$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 3).

(3) CD4+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 223.2 ± 10.7 (x10^4), 대조군이 25.1 ± 7.9 (x10^4), MTX 투여군이 273.6 ± 2.8 (x10^4), GHS 200 mg/kg 투여군이 95.6 ± 2.3 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (***$p<0.001$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 3).

(4) CD4+/CD25+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD4+/CD25+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 29.3 ± 1.1 (x10^4), 대조군이 6.5 ± 2.6 (x10^4), MTX 투여군이 31.1 ± 1.8 (x10^4), GHS 200 mg/kg 투여군이 12.7 ± 1.2 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (*$p<0.05$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 3).

(5) CD8+ 발현에 미치는 영향

DLN에서 CD8+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 93.4 ± 4.5 (x10^4), 대조군이 10.9 ± 6.3 (x10^4), MTX 투여군이 138.3 ± 9.4 (x10^4), GHS 200 mg/kg 투여군이 41.5 ± 2.5 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (**$p<0.01$) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effects of GHS on Absolute Number of Cells in DLN of CIA Mice

	WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
CD19+(x10^4)	105.3 ± 3.2	35.3 ± 1.5	102.0 ± 6.7***	56.3 ± 4.5**
CD3+ (x10^4)	311.5 ± 4.7	36.6 ± 5.1	407.2 ± 2.1***	127.8 ± 6.6***
CD4+ (x10^4)	223.2 ± 10.7	25.1 ± 7.9	273.6 ± 2.8***	95.6 ± 2.3***
CD4+/CD25+(x10^4)	29.3 ± 1.1	6.5 ± 2.6	31.1 ± 1.8***	12.7 ± 1.2*
CD8+ (x10^4)	93.4 ± 4.5	10.9 ± 6.3	138.3 ± 9.4	41.5 ± 2.5

3) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3+ 발현에 미치는 영향

Paw joint에서 CD3+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 12.3 ± 3.2 (x10^5), 대조군이 137.8 ± 35.1 (x10^5), MTX 투여군이 53.6 ± 4.1 (x10), GHS 200 mg/kg 투여군이 42.0 ± 25.6 (x10^5)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (*$p<0.05$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

(2) CD11+b/Gr-1+ 발현에 미치는 영향

Paw paw joint에서 CD3+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 3.5 ± 0.5 (x10^5), 대조군이 183.0 ± 7.1 (x10^5), MTX 투여군이 35.7 ± 7.5 (x10), GHS 200 mg/kg 투여군이 30.3 ± 8.6 (x10^5)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (***$p<0.01$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

Table 4. Effects of GHS on the Absolute Number of Cells in Paw joint of CIA Mice

	WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
CD3+(x10^5)	12.3 ± 3.2	137.8 ± 35.1	53.6 ± 4.1*	42.0 ± 25.6*
CD11+b/Gr-1+(x10^5)	3.5 ± 0.5	183.0 ± 7.1	35.7 ± 7.5***	30.3 ± 8.6***

4) PBMC 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD19+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 29.8 ± 0.1 (%), 대조군이 23.8 ± 1.6 (%), MTX 투여군이 22.7 ± 2.9 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 28.9 ± 3.1 (%)로 나타났다(Table 5).

(2) CD3+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3+ 세포수를 absolute number로 산출한 결

과, 정상군이 60.3 ± 2.8 (%), 대조군이 69.4 ± 0.5 (%), MTX 투여군이 68.3 ± 0.7 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 52.1 ± 5.9 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (*p<0.05) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

(3) CD3+/CD69+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3+/CD69+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 8.3 ± 2.0 (%), 대조군이 37.4 ± 0.9 (%), MTX 투여군이 22.9 ± 1.0 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 12.5 ± 2.4 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

(4) CD4+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD4+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 45.2 ± 3.6 (%), 대조군이 65.9 ± 1.7 (%), MTX 투여군이 48.8 ± 0.4 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 48.0 ± 5.3 (%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

(5) CD8+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD8+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 7.8 ± 0.1 (%), 대조군 8.2 ± 0.7 (%), MTX 투여군 10.1 ± 0.3 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 8.4 ± 0.7 (%)로 나타났다(Table 5).

(6) CD3+/CD49b+ 발현에 미치는 영향

PBMC에서 CD3+/CD49b+ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 3.74 ± 0.9 (%), 대조군이 6.22 ± 0.2 (%), MTX 투여군이 5.38 ± 0.4 (%), GHS 200 mg/kg 투여군이 1.64 ± 0.6 (%)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effects of GHS on the Percentage of Cell Populations in PBMC

	WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
CD19+ (%)	29.8 ± 0.1	23.8 ± 1.6	22.7 ± 2.9	28.9 ± 3.1
CD3+ (%)	60.3 ± 2.8	69.4 ± 0.5	68.3 ± 0.7	52.1 ± 5.9*
CD3+/CD69+(%)	8.3 ± 2.0	37.4 ± 0.9	22.9 ± 1.0***	12.5 ± 2.4***
CD4+ (%)	45.2 ± 3.6	65.9 ± 1.7	48.8 ± 0.4***	48.0 ± 5.3**
CD8+ (%)	7.8 ± 0.1	8.2 ± 0.7	10.1 ± 0.3*	8.4 ± 0.7
CD3+/CD49b+(%)	3.74 ± 0.9	6.22 ± 0.2	5.38 ± 0.4	1.64 ± 0.6***

4. 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) 혈액내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-6 생성량에 미치는 영향

IL-6 생성량은 정상군이 5.5 ± 0.4 (pg/ml), 대조군이 82.9 ± 4.5 (pg/ml), MTX 투여군이 19.2 ± 4.4 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 32.3 ± 4.1 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(**p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

(2) TNF-α 생성량에 미치는 영향

TNF-α 생성량은 정상군이 26.6 ± 0.5 (pg/ml), 대조군이 219.0 ± 9.8 (pg/ml), MTX 투여군이 46.7 ± 1.8 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 121.9 ± 2.4 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effects of GHS on the Levels of Cytokines in the Serum of CIA Mice

	WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
IL-6 (pg/ml)	5.5 ± 0.4	82.9 ± 4.5	19.2 ± 4.4***	32.3 ± 4.1**
TNF-α (pg/ml)	26.6 ± 0.5	219.0 ± 9.8	46.7 ± 1.8***	121.9 ± 2.4***

2) 비장세포 부유액내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IFN-γ 생성량에 미치는 영향

IFN-γ 생성량은 정상군이 396.3 ± 2.6 (pg/ml), 대조군이 601.6 ± 4.3 (pg/ml), MTX 투여군이 382.0 ± 0.1 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 393.9 ± 2.2 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

(2) CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 920.9 ± 14.7 (pg/ml), 대조군이 807.7 ± 15.5 (pg/ml), MTX 투여군이 909.5 ± 10.2 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 913.4 ± 6.6 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(***p <0.001) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 7).

(3) 콜라젠으로 활성화된 비장세포의 IFN-γ 생성량에 미치는 영향

IFN-γ 생성량은 정상군이 87.2 ± 2.4 (pg/ml), 대조군이 570.5 ± 6.7 (pg/ml), MTX 투여군이 69.2 ± 3.0 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 92.6 ± 2.3 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(***p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

(4) 콜라젠으로 활성화된 비장세포의 IL-4 생성량에 미치는 영향

IL-4 생성량은 정상군이 201.2 ± 1.4 (pg/ml), 대조군이 42.6 ± 2.5 (pg/ml), MTX 투여군이 100.8 ± 2.8 (pg/ml), GHS 200 mg/kg 투여군이 98.6 ± 14.8 (pg/ml)로 나타나, 대조군에 비하여 유의성(**p<0.01) 있는 증가 효과를 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effects of GHS on Cytokines Production in the Culture Supernatant in Splenocytes

		WT	CT	MTX	GHS 200 mg/kg
CD3/CD28	IFN-γ (pg/ml)	396.3±2.6	601.6±4.3	382.0±0.1***	393.9±2.2***
	IL-4 (pg/ml)	920.9±14.7	807.7±15.5	909.5±10.2**	913.4±6.6***
CII	IFN-γ (pg/ml)	87.2±2.4	570.5±6.7	69.2±3.0***	92.6±2.3***
	IL-4 (pg/ml)	201.2±1.4	42.6±2.5	100.8±2.8***	98.6±14.8**

고 찰

류마티스관절염 (RA)이란 활막 조직을 침범하는 원인을 알 수 없는 만성이고, 진행성인 자가 면역질환으로 비가역적 관절 손상, 만성 통증, 강직과 기능적 손상을 일으킨다[1].

이는 한의학에서 '痺證'의 범주로 해당되는데, 현재 중의에서는 類風濕關節炎으로 기술하고 있다. 그러나 일반적인 痺證에 비해 病邪가 비교적 깊게 經絡에 침입하여 骨骼에 이르러 극렬한 동통과 관절의 변형을 초래함으로써 頑痺로 표현되며, 증상면에 있어 《金匱要略 · 中風歷節病脈證幷治篇》의 "諸肢節疼痛, 身體魁羸, 脚腫如脫…"의 기술과 유사하여 歷節風의 범주로 보는 제가들이 많다[6-10].

病因, 病機와 臨床 표현이 다양하여 舌苔, 脈象 및 臨床 症狀에 대한 종합적인 관찰이 요구된다. 辨證은 風重型, 濕重型, 寒重型을 중심으로 化熱型, 錯雜型 등으로 나누어지나[7-10], 증상에 따

라 활동기와 완해기로 구분되며, 활동기는 寒濕痺, 濕熱痺의 두 가지 증형과, 완해기에는 痰瘀痺沮, 肝腎虧損 등의 증형으로 대별된다. 따라서 치법에 있어 風寒濕이 심한 경우 祛風寒除濕法을, 濕熱이 중한 경우에는 淸熱除濕法을, 이차적으로 血瘀脈沮한 者는 活血化瘀, 通經活絡法을 다용하고, 허증인 肝腎虧損인 경우에는 補肝益腎, 疏通經絡法을 사용한다.

본 시료인 加味海桐皮散은 祛風利濕, 活血止痛 효능이 있는 약물로 구성되어 임상에서 급만성 관절염 질환에 광범위하게 응용되고 있으며, 특히 강[17]은 본 시료의 기본방인 海桐皮散의 항류마치스 작용을 실험적으로 규명한 바가 있다.

본 실험에서 사용한 양성대조군인 MTX는 임상에서 폭넓게 사용되는 류마티스 관절염 치료제로, dihydrofolate(FH2)가 tetrahydrofolate (FH4)로 되는데 필수적인 dihydro folate reductase와 결합하여 FH4의 생성을 억압하는 엽산 유도체이다. 긍정적인 치료 효과와 더불어 간수치의 상승, 구내염, 오심, 설사나 탈모증의 부작용이 보고되고 있다[22].

RA는 염증성 질환으로 관절내의 염증성 사이토카인인 TNF-α 와 IL-1β가 증가하는 것으로 알려져 있으며, RA 동물 모델인 콜라겐-유도 관절염 (CIA) 마우스의 초기 및 진행 단계에 염증성 사이토카인과 CD4+ T 림프구 등의 면역학적 요인들이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[23,24]. 이는 특히 Th1과 Th2 사이토카인(Fig. 3)의 balance가 깨지면서 Th1-우의 사이토카인이 만들어져 나타나는 질환으로 보고되고 있다[25]. 본 실험에서도 Th과 Th2 사이토카인의 balance가 깨진 CIA 생쥐에서 Th1-우의인 IFN-γ의 생산량이 加味海桐皮散을 투여한 후 감소되었고(Table 7), 상대적으로 IL-4의 생산량은 증가됨(Table 7)을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 加味海桐皮散이 CIA에서 CD4+ T 세포 반응 억제 효과를 통하여 Th1에서 Th2로 전환 유도와 더불어 강력하게 Th1-우의 사이토카인의 활성을 억제함을 시사해 주고 있다.

상기한 바와 같이 궁극적으로 T 세포는 RA의 면역 염증 질환 유발과 관절의 파괴에 있어 주요한 역할을 담당한다. 그 중 IFN-γ 생산이 우세한 상태로 Th1-like subpopulation으로 불리우는 CD4+ T-helper 세포와 대식세포는 만성 RA에서 활막의 파괴 및 침윤, 그리고 질환의 진행에 주도적 역할을 담당한다[26]. CD4+ T 세포와는 달리 CD8+ T 세포는 CIA의 병리에서 억제 역할을 하는 것으로 보고27)되어, 이 둘 세포는 관절염 억제와 진행에 중요한 역할을 담당하며, 그 양상이 조직이나 위치에 따라 달리 기능을 갖는 것으로 알려져 있다[28].

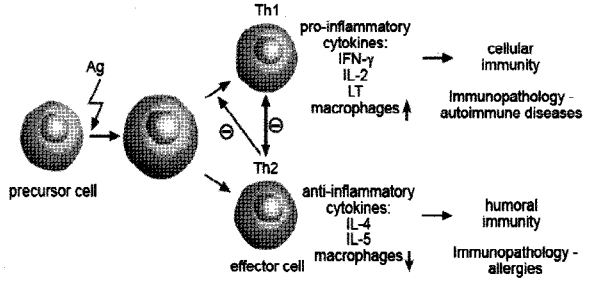

Fig. 3. Differentiation of T helper cells into Th1 or Th2 effector cells.

본 연구에서 DBA/1J 생쥐에 CII 주사 후 10주 이상 된 CIA 생쥐에서 비장은 정상군의 비장보다는 상대적으로 커져 있었다. 즉 총 비장세포수가 대조군에서 증가되어 있다는 것이다. 이는 비장 면역세포를 이루는 T 세포와 B 세포 등이 CII에 의하여 자가항체가 만들어지면서 흉선의 T세포와 림프의 B 세포의 분화를 유도하여 증가하는 것으로 생각된다. 이에 비해 加味海桐皮散을 투여한 CIA 생쥐의 총 비장세포수는 상대적인 감소를 나타내었다(Fig. 2). 또한 FACS 분석 데이터를 적용한 비장 총절대세포수(Absolute No.)에 영향을 주어 CD3+ T 세포는 큰 변화가 없었지만(Table 2), B 세포는 감소를 나타내었다. 아울러 비장에서 활성화된 T 세포인 CD3+CD69+ T 세포는 대조군에서 증가가 나타났고, 加味海桐皮散을 투여한 CIA 생쥐에서는 감소를 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 CII에 대한 APC나 activated T 세포의 숫자와 관련해서 염증사이토카인 (IL-6, TNF-alpha)와 혈청 collagen type II IgG Ab의 수준에 영향을 미침으로써 혈청에서 감소를 나타낸 것으로 사료된다.

CIA 생쥐의 PBMC에서는 CII를 주사한 대조군 CD3 T세포의 %는 정상군에 비하여 증가가 되어 있다. 정상 동물에서 CD3:CD19=60%:30%를 유지하지만 대조군에서는 CD3:CD19=70%:20%으로 나타난다. 즉, CD3 T 세포는 CD4 Th 세포, CD8 c/s T cell, 그리고 CD49b (DX5)/CD3 NKT 세포로 이루어져 있는데, 다만 CD3 T세포 중 자가면역 질환에 영향을 주는 helper T 세포 (CD4+)의 수자는 정상군에 비하여 대조군의 CD4+ 수자가 증가를 나타낸다. CIA 생쥐가 Th1 우의 자가면역질환 (IFN-γ 증가)이기 때문에 CD4+-IFN-γ production Th1 cells의 수가 현저하게 증가된 것을 CII coating이나 Lymphokine assay (CD3/CD28)의 결과(Table 7)에서도 확인할 수 있다.

또한 비장에서와 같이 CD3+/CD69+세포는 CII에 의한 활성 T세포 (CD3+/CD69+)의 변화는 중요하기에 정상군에 비하여 질환을 유발한 대조군의 활성 T세포 (CD3+/CD69+)는 현저하게 증가하게 되어 있다. 이는 비장에서와 마찬가지로 CII에 대한 APC나 activated T 세포의 수자와 관련해서 염증사이토카인 (IL-6, TNF-alpha)와 혈청 collagen type II IgG Ab의 수준(level)에 지대한 영향을 주기 때문이다. 본 실험에서도 加味海桐皮散의 투여로 관절염 생쥐의 PBMC에서 CD4+와 activated CD3+CD69+T 세포(%)가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소를 나타내었다(Table 5). 또한 최근 NKT (CD3+DX5+)가 관절염에서 autoantibody의 매개로 인하여 활성화와 증가가 일어나고, CII에 의한 관절염 모델에서 Th1/Th2 균형의 변화에 NKT가 큰 역할을 한다는 보고29)가 있는데, 본 실험에서도 PBMC에서 대조군에 비하여 NKT (CD3+CD49b (DX5+))(%)의 유의성 있는 감소가 관찰되어(Table 5) 부합되는 결과가 도출되었다.

DLN는 생쥐에서 naive한 T 세포와 B 세포가 있는 곳으로 연구 결과, CII 주사후 10주 이상된 CIA 생쥐에서의 대체적으로 림프절(DLN)은 정상군에 비하여 현저하게 작아져 있다. 이는 관절염 염증 조직으로 염증 T 세포를 계속 공급받아야 되는 염증 질환 메카니즘의 일환으로, DLN의 naive T 세포 등이 염증조직에서의 DC나 APC 세포에 의한 Cross-presentation에 의하여 활

성화된다[30]. 그리고 DC나 APC 세포가 DLN로 homing하여 활성화 시킨 염증 면역 mature T 세포를 계속적으로 관절염 염증 조직으로 이동시키기 때문에 DLN의 총세포수와 면역세포수는 만성일수록, 염증이 심화될수록 현저하게 감소를 하게 된다. 본 실험에서도 정상군에 비하여 대조군의 DLN의 총세포수가 현저히 감소하였고, 加味海桐皮散의 투여로 대조군에 비하여 DLN의 총세포수가 유의성있게 증가가 나타났다(Fig. 3). 또한 DLN의 대조군에서 CD3+T 관련된 CD3+CD69+, CD4+, 그리고 CD8+T 세포가 정상군에 비하여 현저하게 감소되어 있었고, 加味海桐皮散의 투여로 CD3+CD69+, CD4+ 그리고 CD8+ T 세포 등이 모두 유의성 있게 증가를 나타내었다(Table 3).

Regulatory T 세포는 CD4+CD25+Foxp3+ 세포로 생쥐와 흰쥐에서 자가면역질환의 증진을 억제한다고 알려져 있다. 또한 CIA에서 Regulatory T 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 보고[31]되었으며, in vitro와 in vivo에서 활성 억제와 peripheral tolerance를 유지하는 것으로 알려져 있다[32]. 본 연구에서도 DLN에서 CD4+CD25+ T 세포의 absolute number가 대조군에 비하여 현저하게 증가되어(Table 3), CD4+CD25+ T 세포의 up-regulation을 관찰할 수 있었다. 그러나 CD4+CD25+ T 세포가 증가하였다고 하여 반드시 Regulatory T 세포가 증가하였다고는 볼 수 없다. 따라서 향 후 regulatory T 세포가 되기 위한 CD62L이나, CD152, 그리고 Foxp3 유전자가 증가가 있었는지에 대한 보완적인 연구가 필요하다[33].

CIA 관절 생쥐에서 관절염 염증 부위로 CD3+ T 세포와 CD11b+Gr-1+(과립구세포)세포의 침윤이 많이 일어나는 것으로 알려져 있는데[34]. 본 연구에서도 加味海桐皮散의 투여로 대조군에 비하여 CD3+ T 세포와 CD11b+Gr-1+(과립구세포)세포의 총세포수가 유의성 있게 감소를 나타내었다.

최근 RA의 질병 발생과 면역체계의 한부분인 B 세포의 역할과 치료상의 목표로서 B 세포의 잠재적 역할에 대한 논의가 다양하게 진행되고 있다. B 세포는 염증사이토카인을 생산하는 APC 세포와 같은 활동을 하는 것으로 알려져 있고, 활성 T 세포의 자극과 rheumatoid factor (RF) autoantibody의 생산을 하는 것으로 보고되고 있다[35]. 또한 alpha-beta T 세포는 CIA 발병에 필수적이고 CII에 대한 IgG 반응에도 작용한다. 그에 반하여 gamma-delta T 세포는 CIA 발병을 억제하는 것으로 보고[36]되었는데, 본 연구에서는 CD19+ B 세포수는 DLN와 비장에서 감소하였다(Table 2).

RA의 특징적 양상은 말단가동관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염이며 대칭으로 분포한다. 이 질환의 특징은 활막의 과증식, 혈관형성, 관절연골과 연골하 골의 침식 등이며, 결국 관절의 변형을 가져온다. 류마치스 활액 조직은 혈관내막 대식세포와 섬유아세포양 활액세포의 숫자 증가와 T세포, 세포질세포, 대식세포, 기타 활액내 세포들의 축적으로 특징 지워진다. 침투된 활액세포는 다양한 cytokine들, 대개 IL-1, IL-6, TNF-α등을 과잉 생산하며, 고착분자와 단백질분해효소 (MMPs)의 유전자 발현 등의 생산을 증가시킨다[37]. 이러한 요소들이 다른 염증세포의 유인과 활성화 및 연골과 골의 쇠퇴에 중요한 역할을 한다[38]. 초기의 조직학적 소견은 미세혈관의 손상과 조직의 부종, 활막세포의 증식과 혈관 주위의 림프구 침윤 등이다. 최근의 연구는 이들이 무작위적으로 조직내로 침윤한 것이 아니라 어떤 항원에 의한 반응으로 침윤된 것으로 인정되고 있다. T림프구 이외에도 B림프구, plasma cell, 비만세포, 대식세포의 침윤도 관찰된다. 류마티스 활막은 활성화된 림파구, 대식세포, 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물이 존재하는 것이 특징이며, 이들 cytokine의 국소적인 생산물이 RA의 병리적 임상적 양상의 원인으로 생각되고 있다[39]. 이들 cytokine으로는 T림프구에서 나온 IL-2, IL-6, 과립세포-대식세포 colony 자극요소(GM-CSF), tumor necrosis factor-α (TNF-α), transforming growth factor-β(TGF-β) 등이 있고, 활성화된 대식세포에서 유래하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF, transforming growth factor-β(TGF-β) 등이 있으며, 이 외에 fibroblast, endothelial cell 등에서 분비하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF 등이 있다. 즉 RA 조직에서 cytokine mRNA와 protein의 분석은 모든 환자에서 IL-1, IL-6, TNF-α, GM-CSF 등과 같은 proinflammatory cytokine과 IL-8과 같은 chemokine이 풍부하다[40]. 이들 cytokine의 활성도가 류마치스 활막염의 여러 양상인 활막 조직 염증, 활막액 염증, 활막 증식, 연골과 골의 손상 등과 RA에서의 전신 양상을 나타내는 원인으로 생각된다.

염증 반응을 널리 전하는 cytokine의 생산에 덧붙여서 cytokine 활동을 저해하는 특이 억제물질(inhibitor)이 생산되며, T 세포 활성화와 증식, B세포 분화와 염증 부위로의 이동 등과 같은 특징적인 류마티스 염증 반응을 억제하는 cytokines의 생산 등 염증을 느리게 하는 국소 인자들이 분비된다. RA 환자의 활액막(synovial membrane)은 비후, 신생혈관의 증가, 염증세포의 침윤 등의 특징이 있으며, 특히 CD4+ T 세포가 중요하다. RA는 MHC class II HLA 항원과의 연관성이 가장 크며, HLA class II의 주된 기능은 CD4+ T세포에 항원성 peptide를 나타내고, 활성화된 CD4+ T세포는 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF-α를 생산하고, 조직을 파괴하는 matrix metalloprotease(MMP)를 분비한다[41]. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연접부의 침식에 의해 발생한다.

본 연구에서는 CIA 생쥐에서 대표적으로 변화가 큰 TNF-α와 IL-6의 분비가 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며(Table 6), 이 같은 결과는 관절염 지수(arthritis index)와 연관되어 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 확인할 수 있었다. 또한 Th1과 Th2 세포에서 분비되는 IFN-γ와 IL-4를 비장세포를 배양하여 측정한 결과, 역시 Th1 세포에서 Th2 세포로 shift 되는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 정리하여 보면 본 시료인 加味海桐皮散은 관절염의 병리 기전에 중요한 역할을 수행하는 염증성 사이토카인의 분비를 억제하고, 또한 TNF-α 및 IL-6 등의 염증성 사이토카인을 분비하게 하는 활성 T 림프구를 억제함으로써 관절염 발병을 지연시켜 관절염 지수 감소를 가져온 것으로 예측되어 진다.

결 론

류마티스관절염 동물 모델을 이용하여 加味海桐皮散의 효능

을 실험적으로 검색하고자, DBA/1J 생쥐에서의 콜라젠으로 관절염을 유발하여, 관절염 발생율, 관절 조직 변화, 관절 조직에서의 면역학적 변화, 혈청 내 rheumatoid factor 농도 및 spleen, draining lymph node (DLN), PBMC에서의 면역 세포 변화 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味海桐皮散은 대조군에 비하여 콜라젠으로 유발된 관절염 발생지수 (Arthritis index)를 유의적으로 감소시켰다. 加味海桐皮散은 대조군에 비하여 생쥐의 혈액 중의 염증성 사이토카인 (IL-6 와 TNF-a)의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 활성화된 비장세포의 IFN-γ 생성은 감소시킨 반면, IL-4 생성은 유의적으로 증가시켰다. 加味海桐皮散은 대조군에 비하여 PBMC에서 CD3+, CD4+, regulatory CD4+/CD25+ T 세포, 그리고 CD8+ 군의 세포 수를 유의적으로 증가시켰다. 加味海桐皮散은 대조군에 비하여 비장 총세포수를 유의적으로 감소시켰으며, 비장세포 내 CD19+, CD3+, CD3+/CD69+, CD4+/CD25+, CD49+군의 세포 수 역시 유의적으로 감소시켰다.加味海桐皮散은 대조군에 비하여 림프절의 총세포수를 유의적으로 증가시켰으며, 림프절내 CD3+, CD3+/CD69+, CD4+, CD4+/CD25+, CD8+, CD49b+, CD3+ CD49+ 군의 세포 수를 유의적으로 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 加味海桐皮散의 면역 조절작용을 통한 항류마치스 효능이 인정되어 새로운 치료제의 가능성을 제시하였다. 그러나 기본방인 해동피산과의 뚜렷한 작용 기전의 차이는 발견할 수가 없어, 향 후 구성 개별 약물의 검색과 더불어 보다 심도있는 접근이 요구된다.

참고문헌

1. 서울대학교의과대학 내과학교실편. 내과학. 고려의학, pp 954-959, 2005.
2. Hartung, A.D., Bohnert, A., Hackstein, H., Ohly, A., Schmidt, K.L., Bein, G. Th2-mediated atopic disease protection in Th1-mediated rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 21: 481-484, 2003.
3. Nixon, R., Bansback, N., Brennan, A. The efficacy of inhibiting tumour necrosis factor {alpha} and interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis and adjusted indirect comparisons. Rheumatology (Oxford) 46: 1140-1147, 2007.
4. Abramson, S.B., Amin, A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. Rheumatology (Oxford). 41(9):972-980, 2002.
5. Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 14: 397-440, 1996.
6. 하청호 외. 풍습병. 인민군의출판사, pp 197-227, 2007.
7. 오승옥 편저. 류풍습관절염적중의특색요법. 상해중의약대학출판사, pp 25-33, 2004.
8. 하원 외. 중국내과비방전서. 과학기술문헌출판사, pp 830-831, 2006.
9. 陶曉華. 풍습병. 인민위생출판사, pp 260-275, 2002.
10. 고영림 외. 傳家醫案精選. 金盾出版社, pp 1-6, 2005.
11. 윤창열 외. 현토완석황제내경소문왕빙주. 주민출판사, pp 172-187, 2003.
12. 곽설신 외. 풍습병효방400수. 과학기술문헌출판사, p 21, 2005.
13. 오민석 외. 류마토이드 관절염의 한양방학적 약물치료의 최신 경향 고찰. 대전대학교 한의학연구소논문집, 11(1):217-235, 2002.
14. 서혜경 외. 류마토이드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應 동의병리학회지 17(3):780-786, 2003.
15. 조영주 외. 희렴이 RA 병태 모델에서 關聯因子 및 組織學的 변화에 미치는 영향 동의병리학회지 17(2):403-411, 2003.
16. 김경호 외. 유백피, 계지, 우슬, 봉독 및 우황, 웅담, 사향복잡제제 약침이 mouse 의 LPS 유발 관절염의 혈액학적 변화에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌 18(1):157-169, 2001.
17. 강성엽 외. 해동피산의 콜라겐으로 유발된 류마티스관절염 억제 효과. 동의병리학회지 21(4):982-991, 2007.
18. 이영철 외. 忍冬藤의 免疫調節作用에 대한 實驗的 硏究(Ⅱ). 大韓本草學會誌, 20(4):141-149, 2005.
19. 徐榮培. 忍冬등 ethyl acetate fraction이 T 림프구에 미치는 影響. 大韓本草學會誌 18(3):113-129, 2003.
20. 강삼식 외. 인동추출물에 대한 항염증 및 진통작용 비교, 생약학회지 25(4):363-367, 1994.
21. Levin, Irwin, P. Relating statistics and experimental design. Thousand Oaks, CA. Sage Publications. Quantitative Applications in the Social Sciences series #125. Elementary introduction covers t-tests and various simple ANOVA designs. Some additional discussion of chi-square, significance tests for correlation and regression. and non-parametric tests such as the runs test, median test, and Mann-Whitney U test, 1999.
22. Weinblatt, M.E. Toxicity of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 12: 35-39, 1985.
23. Thorbecke, G.J., R. Shah, C.H. Leu, A.P. Kuruvilla, A.M. Hardison, and M.A. Palladino. Involvement of endogenous tumor necrosis factor a and transforming growth factor p during induction of collagen type I1 arthritis in mice. Proc. Natl. Acad. Sei. USA 89: 7375, 1992.
24. Brahn. E., D.J. Peacock, M.L. Banquerigo, and D.Y. Liu. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-a) on collagen arthritis. Lymphokine Cyfukine Res. 11: 253, 1992.
25. Williams, R.0.. M. Feldmann, and R.N. Maini. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Pruc. Nafl. Acad Sci. USA 89: 9784, 1992.
26. 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 39: 1961-1969, 1996.

27. Kadowaki, K.M., Matsuno, H., Tsuji, H., Tunru, I. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. Clinical and Experimental Immunology 97: 212-218, 1994.
28. Williams, R.O., Whyte, A., Waldmann, H. Resistance to collagen induced arthritis in DBA/1 mice by intraperitoneal administration of soluble type II collagen involves both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Autoimmunity 4: 237-245, 1989.
29. Chiba, A., Kaieda, S., Oki, S., Yamamura, T., Miyake, S. The involvement of V(alpha)14 natural killer T cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. Arthritis Rheum. 52(6):1941-1948, 2005.
30. Kai, H., Shibuya, K., Wang, Y., Kameta, H., Kameyama, T., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Honda, S., Matsumoto, I., Koyama, A., Sumida, T., Shibuya, A. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. Immunology. 118(2):233-239, 2006.
31. Morgan, Flierman, R., van Duivenvoorde, L.M., Witteveen, H.J., van Ewijk, W., van Laar, J.M., de Vries, R.R., Toes, R.E. Effective treatmentof collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 regulatoryT cells. Arthritis and Rheumatism 52: 2212-2221, 2005.
32. Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. Advances in Immunology 81: 331, 2003.
33. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., O'Valle, F., Delgado, M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. Arthritis Rheum. 56(2):531-543, 2007.
34. Lee, S.I., Hyun, P.M., Kim, S.H., Kim, K.S., Lee, S.K., Kim, B.S., Maeng, P.J., Lim, J.S. Suppression of the onset and progression of collagen-induced arthritis by chebulagic acid screened from a natural product library. Arthritis Rheum. 52(1):345-353, 2005.
35. Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., Weyand, C.M. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. Journal of Immunology 167: 4710-4718, 2001.
36. Corthay, A., Johansson, A.,Vestberg, M., Holmdahl, R. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. International Immunology 11: 1065-1073, 1999.
37. Feldmann, M., Maini, R.N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu Rev Immunol 19: 163-196, 2001.
38. Rosloniec, E.F., Cremer, M., Kang, A., Myers, L.K. Collagen-induced arthritis. In Current Protocols in Immunology. J.E., Coligan, A.M., Kruisbeek, D.H., Margulies. E.M. Shevach, and W. Strober, eds. Wiley, New York, 15, 5, 1, 2001.
39. Iwai, H., Kozono, Y., Hirose, S., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K., Kohsaka, H., Miyasaka, N., Azuma, M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blocade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. J of Immunol 169: 4332-4339, 2002.
40. Aaron Barchowsky. Integration of the NF-B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the Collagenase-1 promoter: Divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts, Cytokine, 12(10):1469-1479, 2000.
41. Bradley, D.S., Nabozny, G.H., Cheng, S., Zhou, P., Griffiths, M.M., Luthra, H.S., David, C.S. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice: implications in human rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 100: 2227-2234, 1997.