원저

소염약침액이 Collagen II 유발 관절염 mouse의 TNF-α, IFN-γ 생성 및 비장세포 증식에 미치는 영향

• 유화승* 대전대학교 한의과대학 동서암센터
• 윤대환** 동신대학교 한의과대학 경혈학교실
• 김승형*** 대전대학교 동서생명과학연구원
• 임종순*** 대전대학교 동서생명과학연구원

Inhibitory Effects of Soyeum Pharmacopuncture (SPP) on Rheumatoid Arthritis in Collagen II-induced Arthritis (CIA) Mice

Hwa-Seung Yoo*, Dae-Hwan Youn**, Seung-Hyung Kim***, Jong-Soon Lim****
* East-West Cancer Center, College of Oriental Medicine, Daejeon University
** Department of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, Dongshin University
*** Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University

ABSTRACT

Objective The aim is to examine the effect of Soyeum Pharmacopuncture (SPP) on collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1OlaHsd mice.

Methods To determine the effect of SPP on chronic IFNlammatory joint disease, we induced CIA in DBA/1OlaHsd mice by immunization with bovine type II collagen. Animals were treated with intraperitoneal injection doses of 2 mg/kg of SPP, beginning 3 days before the expected onset of disease symptoms. Inhibitory Effects of SPP were observed by serum levels of TNF-α, and IFN-γ,, or cell proliferation in the spleen cell culture and histological examination of knee joint.

Results In the CIA Mice, serum levels of TNF-α, and IFN-γ, production in the spleen cell culture were reduced. At the histopathological examination of knee joint, chondropathy of cartilage in the synovial joint in the SP group was repaired while compared with control group.

Conclusion These results suggest that the SPP may be effective for the prevention and treatment of rheumatoid arthritis disease.

Key word Chelidonium majus Arthritis; TNF-α; IFN-γ

I. 서론

류마티스 관절염은 염증 세포의 침윤과 활막의 현저한 이상 증식 (hyperplasia)으로 뼈와 관절이 파괴되는 만성 염증성 질환이다. 많은 연구에도 불구하고 아직 그 원인이 정확하게 규명되지 못한 채, 인종에 따라 차이는 있지만 인구의 1% 정도가 이 질환으로 기능 장애를 겪고 있다고 알려져 있다[1-2].

류마티스 관절염의 병리 기전에는 염증성 사이토카인, TNF-α (tumor necrosis factor-α)와 IFN-γ (interferon-γ)가 밀접하게 연관되어 있다[3-4]. 류마티스 관절염의 치료에는 현재 비스테로이드 항염증 제제 (nonsteroidal anti-IFNlammatory drugs, NSAIDs)와 항류마티스 제제 (disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)가 많이 사용되고 있으나, 비스테로이드 항염증 제제는 주로 염증 반응에 관여하는 여러 물질 중 하나의 물질만을 차단하는 제제들로, 전체적인 면역-염증 반응을 차단할 수 없으며 관

※ Address correspondence and requests to Jong-Soon Lim, PhD, Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon 300-716, Republic of Korea. E-mail: limjs@dju.ac.kr.

절의 파괴를 억제할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 반면, 항류마티스 제제들은 염증 뿐 아니라 질병 진행 자체를 억제할 수 있어 최근에는 관절염의 발병 초기부터 사용되고 있으며[5], 치료효과가 나타나면 통증, 부종 및 관절의 파괴를 막을 수 있다는 큰 장점을 가지고 있지만, 아직 작용 기전이 정확히 밝혀지지 않은 제제들이 많으며, 임상시험 결과 전체 환자의 20~25%에서만 치료 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[6-7].

또한, 최근에 사용되기 시작한 항류마티스 제제의 일종인 생물학 제제, 예를 들어 항-TNF-α 항체 (예: 엔브렐 (Enbrel) 또는 레미케이드 (Remicade)) 등은 가격이 비싸 비용적인 측면에서 효과적이지 못하며, TNF-α의 차단으로 인한 면역 체계의 변화로 감염 및 약물 과민 반응을 일으킬 위험이 높은 것으로 보고되어 있다[8-9]. 따라서, 새로운 작용 및 약물 구조를 가지며 류마티스 관절염의 진행을 억제하고, 관절의 파괴를 방지할 수 있는 효과적인 신물질의 개발이 요구되고 있다. 이러한 신물질은 민간요법으로 예로부터 사용되어 온 천연물에서 발견될 가능성이 높기 때문에 천연물, 특히 생약으로부터 신약을 창출하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

생약을 이용한 한약의 병리적 염증 억제효과에 대한 최근 관련 연구로는, 계혈등의 항염 활성 효과[10], 현호색, 홍화 및 적작약이 관절염 흰쥐의 염증과 간에 미치는 영향[12], 및 희첨이 염증성 사이토카인 및 류마티스양 관절염에 미치는 영향[13] 등이 보고된 바가 있다. 또한, 소염 약침에 대한 연구로는 스타필로코쿠스 아우레우스 (staphylococcus aureus)에 미치는 영향[14-15], 등이 보고된 바가 있으나 이들은 증류 약침액에 관련된 연구로, 동결건조분 (기제)을 이용한 소염 약침액에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

상기 약침 (pharmacopuncture)이란 인체 질병에 대하여 가장 치료율이 높을 수 있는 약물을 선정하여 유효성분을 추출한 후에 약물 추출액을 해당 질병에 가장 효과적으로 작용할 수 있는 경혈 또는 통처에 주사기를 사용하여 주입하는 방법으로서 경락 경혈의 치료작용과 약물의 약리작용을 혼합한 새로운 한방 치료법이다.

소염약침은 한약 처방 중 항균 및 항알러지 효능이 있다고 알려진 황련해독탕 (黃連解毒湯)에 염증억제효과를 위해 숙지황 (地黃, Rehmannia glutinosa), 금은화 (金銀花, Lonicerae flos), 포공영 (蒲公英, Taraxaci herba), 연교 (連翹, Forsythiae fructus)를 추가한 탕약을 동결건조한 분말을 희석해 만든 약물이다. 상기 약재들은 모두 소염에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 이는 일반적인 염증에 효과가 있는 것일 뿐, 이들이 관절염의 예방 또는 치료에 효과가 있다는 것은 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 류마티스 관절염을 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위해 계속 연구를 진행하던 중, DBA/1OlaHsd 생쥐에 collagen II를 감작하여 관절염을 유도한 후 소염약침물을 투여하여 혈청내의 TNF-α 생성, 비장세포를 배양한 배양상층액내의 IFN-γ 생성, collagen type II에 대한 비장세포의 증식 및 조직학적 변화 등을 관찰한 바 소염약침시술이 관절염의 병리 기전에 중요한 역할을 수행하는 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 비장세포 내 IFN-γ, 및 비장세포의 증식 등을 억제하여 관절염의 발병을 지연시킴으로써 류마티스 관절염을 예방 또는 치료할 수 있음을 발견하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 6주령의 DBA/1OlaHsd 마우스 (폴라스인터내셔널, 영국)를 22±2℃, 습도 50±10% 및 광주기 12L (200~300 Lux)/12D의 조건 하에서 고형 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, 항생제 무첨가; 삼양사, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주일 동안 순응시킨 다음, 3마리씩 4군으로 나누었다.

2) 검액 구성

혼합 약재 (입수처: 옴니허브 사, 한국) 500g을 3차 증류수로 세척한 다음, 열탕 추출기 (대웅, 한국)의 반응조 하부에 상기 혼합 약재 및 증류수 2,500㎖를 넣고, 반응조 상부 및 환류 냉각관만을 설치하여 약 1시간 동안 불린 후, 조절기 (controller)의 온도와 시간을 설정한 후 전원을 켜서 약 5℃의 냉각수를 이용하여 105℃에서 120분 동안 전탕하였다 (Table 1).

전탕이 끝난 혼합 약재 농축액을 뷰흐너 깔때기 (Buchner funnel)로 걸러서 여액은 갈색 병에 담은 후, 알콜 용매를 이용하여 하기와 같이 추출하였다.

구체적으로, 상기 혼합 약재 농축액에 전체 용액에 대하여 90% 농도가 되도록 에탄올을 첨가하고 마그네틱 교반기로 3시간 이상 교반하였다. 상기 교반액을 둥근 플라스크에 옮긴 다음, 회전식 진공 증발기 (Rotary Vacuum evaporator,

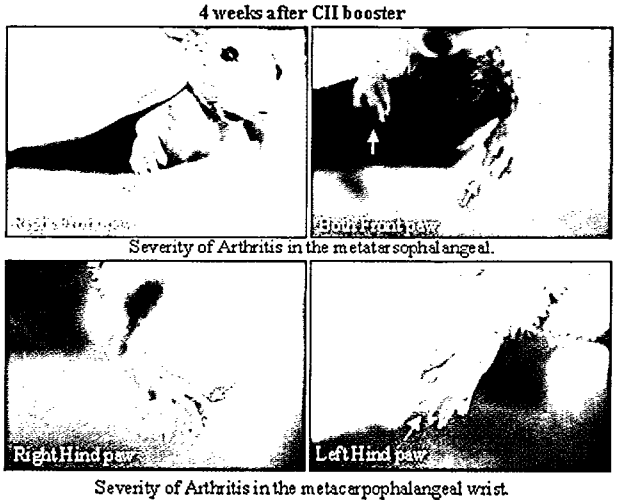

Fig 1. Establishment of collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1OlaHsd mice. Collagen-induced arthritis (CIA) was induced by subcutaneous injection of with 200 ㎍ of bovine type II collagen, suspended in 0.01 mol/L acetic acid and emulsified in complete Freund's adjuvant in DBA/1OlaHsd mice (7-week old, male). A booster injection of 200 ㎍ of bovine type II collagen was performed at three weeks after the initial injection.

Büchi B-480, 스위스) 및 약 5℃의 냉각기를 이용하여 65℃ 이하에서 감압농축하였다.

상기 감압농축액에 전체 용액에 대하여 80% 농도가 되도록 에탄올을 첨가하고 상기와 동일한 방법으로 교반 및 감압농축한 후, 얻어진 감압농축액에 전체 용액에 대하여 70% 농도가 되도록 에탄올을 첨가하고 상기와 동일한 방법으로 교반한 다음, 교반액을 뷰흐너 깔때기로 여과하고 여액을 상기와 동일한 방법으로 감압농축하였다. 이후, 알코올을 완벽하게 제거하기 위해서 상기 감압농축액에 약간의 증류수를 첨가하여 농축액이 거의 캐러멜 상태가 될 때까지 재감압농축한 다음, 와트만 0.45㎛ 여과지 및 와트만 0.2㎛ 여과지로 차례로 여과하였다.

상기 여과액을 동결건조기용 플라스크에 나누어 약 -30℃에서 약 2일 동안 예비 동결한 후, 동결건조기 (EYELA FDU-540, 일본)로 동결건조하여 혼합 약재 건조 분말 (이하, 소염 분말) 약 10g을 얻었다.

〈Table 1〉 Prescription of "Soyeum"

Herb	Botanical name	Relative amount(g)
蒲公英	*Taraxaci herba*	77.4
金銀花	*Lonicerae flos*	77.4
生地黃	*Rehmanniae radix*	77.4
連翹	*Forsythiae fructus*	77.4
黃連	*Coptidis rhizoma*	47.6
黃芩	*Scutellariae radix*	47.6
黃柏	*Phellodendri cortex*	47.6
梔子	*Gardeniae fructus*	47.6
Total amount		500.0

2. 방법

1) 류마티스 관절염 유발 및 군 분리

CIA(collagen-induced arthritis) 유발은 우형 제2형 콜라겐 (bovine type II collagen, Chondrex 사, 미국) 200㎍에 0.01㏖/ℓ 의 아세트산과 완전 프로인트 어쥬반트 (complete Freund's adjuvant, 시그마 사, 미국) 200㎍를 혼합한 후, 상기 혼합물 200㎍을 정상군을 제외한 마우스에 피하 주사하고, 3주 후 동량을 부스팅 (boosting)하여 콜라겐 유발 관절염 (collagen induced arthritis, CIA)을 유발시켰다 (Fig. 1). DBA/1OlaHsd 생쥐 3마리를 한 군으로 관절염을 유발시키지 않은 정상군(Normal), collagen Ⅱ로 류마티스 관

절염 유발시킨 후 치료제를 처리하지 않은 대조군(Control), collagen Ⅱ로 류마티스 관절염 유발시킨 후 methotrexate (0.3mg/kg)를 처치한 군(MTX), collagen Ⅱ로 류마티스 관절염 유발시킨 후 소염약침(2mg/kg)을 처치한 군(SPP)으로 나누었다.

2) 처치

제조된 소염약침의 약재 건조 분말을 생리식염수에 용해시킨 다음, 이를 2 ㎎/㎏의 농도로 실시예 2에서 제조된 실험군 마우스의 복강에 매일 오전 11시에 0.1㎖씩 4주 동안 주사투여 하였다. 또한, 정상군 마우스 및 대조군의 CIA 마우스에는 생리식염수 0.1㎖를 4주 동안 매일 1회 경구 투여하였으며, 양성 대조군의 CIA 마우스에는 메토트렉세이트 (methotrexate, 0.3㎎/㎏, 시그마 사, 미국) 0.1㎖를 4주 동안 매일 1회 복강에 주사투여 하였다.

3) Serum TNF-α 측정

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 삼장천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 TNF-α 생산량 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)로 생산량은 TNF-a ELISA kit (Biosource, 미국)을 이용하여 측정하였다. 각 well에 CIA생쥐의 혈청 100㎕ (1/100 dilution)씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100㎕를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 비장세포 채취 및 배양

CIA mouse 비장조직을 적출하여 4℃의 D-PBS로 3회 세척한 후, 40㎛의 나일론 메쉬에 갈아서 비장세포를 얻었다. 상기 세포를 5% FBS (fetal bovine serum), 페니실린 (100 U/㎖) 및 스트렙토마이신 (100㎍/㎖)이 포함된 RPM 1640 배지 (시그마 사, 미국)에 첨가하여 2×10^6 세포/㎖의 농도로 조정하여 anti-CD3/CD28항체 (1㎍/㎖, Serotec 사)로 코팅된 96웰 플레이트 (Corning 사, 미국)의 각 웰에 분주하여 37℃ Co2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

5) ELISA Analysis

IFN-γ는 비장세포의 배양 종료후 원심분리하여 상층액을 분리한 다음, IFN-γ ELISA 키트 (Biosource, 미국)를 이용하여 비장세포 배양액내 IFN-γ의 생산량을 분석하였다. 구체적으로, 각 웰에 배양 상층액을 100 ㎕씩 분주하고 1시간 동안 실온에서 방치한 후, D-PBS로 2회 세척하고, 각 웰에 바이오틴 콘쥬게이티드 (Biotin conjugated) 항체 (Biosource 사, 미국) 100 ㎕를 처리하고 30분 동안 실온에서 방치한 다음, 2회 세척하였다. 이후, 상기 시험예 1과 동일한 방법으로, 상기 웰에 아비딘-HRP 콘쥬게이티드 항체, TMB 및 스탑 용액을 처리한 다음, ELISA 리더를 이용하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

6) 비장세포 증식

실험 종료 후 비장세포 (2×106세포/㎖)를 각 웰에 분주하여 60시간 후 배양액에 1 ㎍Ci/well당 [메틸-^{3}H] 티미딘 (thymidine) (Amersham 사, 미국)을 첨가한 후, 37.0℃에서 최종 72시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포수집기 (cell harvester, cambridge technology 사, 미국)를 사용하여 유리섬유 여과지 (Glass microfiber filter, Whatman 사) 위에 상기 배양된 세포를 포획하고 건조한 다음, 방사선 측정기 (liquid scintillation counter, LKB 사)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

7) 조직학적 관찰

약물을 4주 동안 투여한 다음, 각 군의 마우스에서 관절을 분리하여 10% 폼알데하이드 용액에 고정한 후, 세절하여 흐르는 물에 8시간 동안 세척한 다음, 통상의 조직 절편 제조 공정에 따라 처리하여 파라핀에 포매하였다. 이것을 초박절편기 (Leica CM1900, Leica 사, 독일)를 이용하여 절편을 만들어 관절조직의 구조를 관찰하기 위해 헤마톡실린-에오신 (Hematoxylin-Eosin) 염색을, 콜라겐 섬유 (collagen fiber)의 축적 정도를 관찰하기 위해 콜라겐 축적 (collagen deposition) 염색인 매슨-트라이크롬 (Masson-Trichrome) 염색을 각각 수행한 다음, 고정된 세포를 광학현미경 (Nikon 사, 일본)을 이용하여 20 배율에서 조직을 관찰하였다.

3. 통계

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

III. 성적

1. TNF-α 생성에 미치는 영향

CIA 동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 혈청내의 TNF-α 생성의 변화를 관찰한 결과, 정상군은 106.4±22.43 pg/ml, 대조군은 586.7±44.52 pg/ml, MTX군은 236.5±14.74 pg/ml, SPP군은 326.4±21.81 pg/ml를 나타내었다.

각 군들의 비교에서 대조군에 비하여 정상군(P<0.01), MTX군(P<0.01) 및 SPP군(P<0.01)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

2. IFN-γ 생성에 미치는 영향

CIA 동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 비장세포를 배양한 배양 상층액내의 IFN-γ 생성의 변화를 관찰한 결과, 정상군은 1109.9±179.53 pg/ml, 대조군은 1622.9±14.57 pg/ml, MTX군은 545.4±171.34 pg/ml, SPP군은 753.9±149.08 pg/ml를 나타내었다.

각 군들의 비교에서 대조군에 비하여 정상군(P<0.05), MTX군(P<0.01) 및 SPP군(P<0.01)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3).

3. 비장세포 증식에 미치는 영향

CIA 동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 collagen type II에 대한 비장세포의 증식을 관찰한 결과, 정상군은 5309.0±315.53 pg/mml, 대조군은 12194.3±1544.99, MTX군은 7429.5±1596.15, SP군은7523.0±1080.92를 나타내었다.

각 군들의 비교에서 대조군에 비하여 정상군(P<0.01)과 SPP군(P<0.05)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 4).

4. 조직학적 관찰

CIA 동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 H&E 염색과 M-T 염색 (collagen deposition)을 통하여 관절(joint)조직을 관찰한 결과, 정상군은 관절강과 활막에 손상이 없는 것을 관찰할 수 있었으나(Fig 5A, 6A), 대조군에서는 관절염 유발에 의해 관절의 침윤, 활막의 손상, 활막조직의 비후 및 연골의 침식 등이 관찰되었다(Fig 5B, 6B). MTX 처리군은 대조군에 비하여 관절강과 활막에서 미약한 손상은 보였지만 면역세포의 침투나 연골의 침식이 적었으며(Fig 5C, 6C), SPP 처리군에서는 대조군에 비하여 관절강과 활막의 손상 및 연골의 침식이 적게 관찰되었다(Fig 5D, 6D).

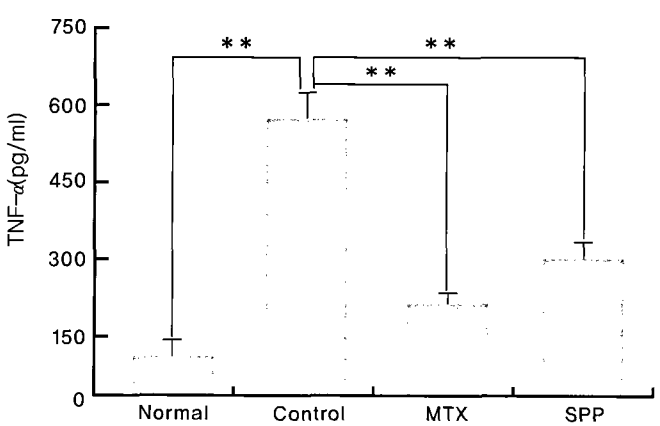

Fig. 2. Effects of Soyeum Pharmacopuncture (SPP) on serum TNF-α in the CIA mouse serum. DBA/1OlaHsd mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 3 mice were treated with MTX, and SPP for 30 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA. Normal, normal DBA/1OlaHsd mice, Control, Collagen-induction arthritis and no treatment. MTX, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 0.3mg/kg Methotrexate. SP, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 2mg/kg SPP. Results are shown as mean±S.E. Statistically significant value compared with control group by T test (**p<0.01).

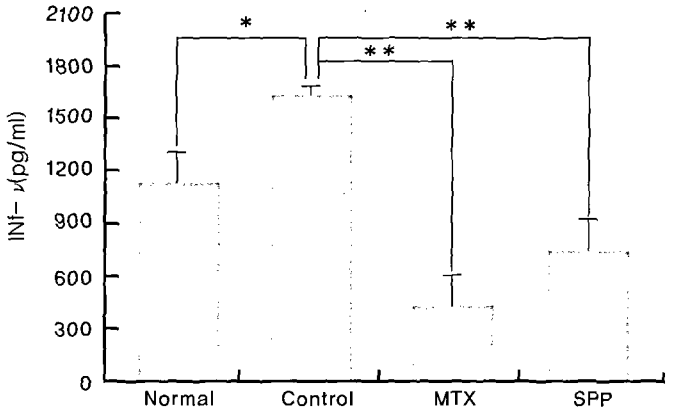

Fig. 3. Effects of Soyeum Pharmacopuncture (SPP) on the level of IFN-γ in the CIA mouse spleen cell culture. DBA/1OlaHsd mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 3 mice were treated with MTX, and SP for 30 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA. Normal, normal DBA/1OlaHsd mice, Control, Collagen-induction arthritis and no treatment. MTX, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 0.3mg/kg Methotrexate. SPP, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 2mg/kg Soyeum Pharmacopuncture solution. Spleen cells were stimulated for 48 h with anti-CD3/CD28 coating, culture supernatants were taken after 48 h and IFN-γ concentrations were assessed by ELISA. IFN-γ production in the culture supernatant was assay by ELISA kit (Biosource, USA), and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Results are shown as mean±S.E. Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01).

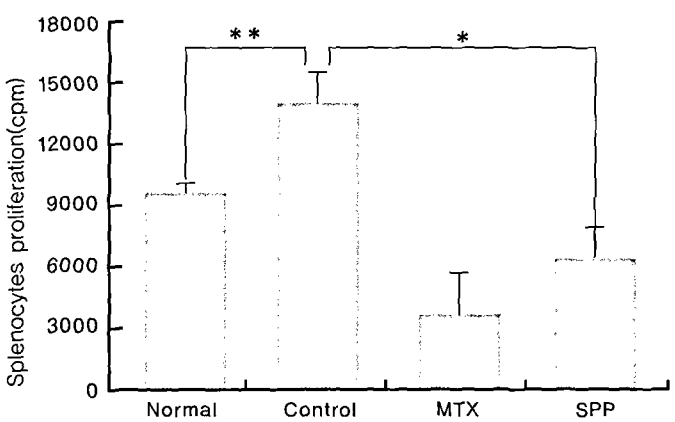

Fig. 4. Effects of Soyeum Pharmacopuncture(SP) on cells proliferation in splenocytes of CIA mouse. DBA/1OlaHsd mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 3 mice were treated with MTX, and SP for 30 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA. Normal, normal DBA/1OlaHsd mice, Control, Collagen-induction arthritis and no treatment. MTX, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 0.3mg/kg Methotrexate. SPP, Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 2mg/kg Soyeum Pharmacopuncture solution. Spleen Cells were cultured in 96-well plates (0.2ml) for 72 h at 37 C/5% CO_2 and pulsed with [^{3}H] thymidine (1μCi/well) during the last 12h. [^{3}H]thymidine incorporation was measured by liquid scintillation counting. Results are shown as mean±S.E. Statistically significant value compared with control group by T test (*p<0.05, **p<0.01).

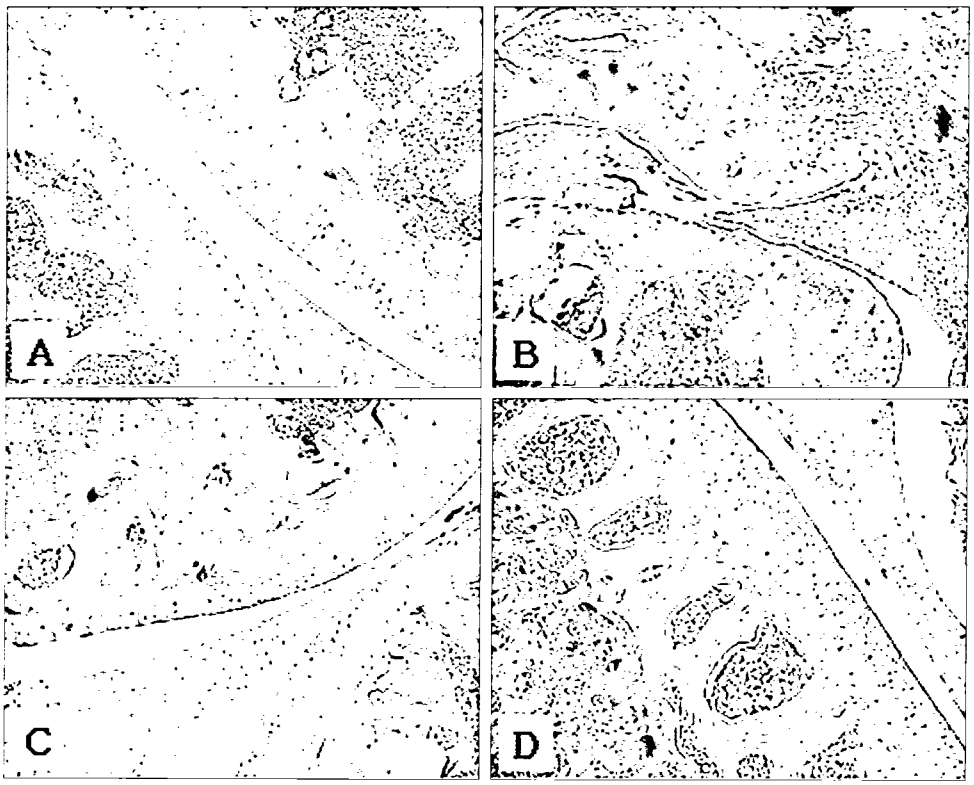

Fig. 5. Histological section of knee joints from CIA mice. DBA/1OlaHsd mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 3 mice were treated with MTX, and SP for 30 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA. A, Normal (normal DBA/1OlaHsd mice). B, Control (Collagen-induction arthritis and no treatment). C, MTX(Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 0.3 mg/kg Methotrexate). D, SPP (Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 2 mg/kg Soyeum Pharmacopuncture solution). H&E staining. Cross-sections of the Hindpaw from a Murine CIA. Original magnifications: X 20.

Ⅳ. 고찰 및 결론

RA의 특징은 활막의 과증식, 혈관형성, 관절연골과 연골하 골의 침식 등이며, 결국 관절의 변형을 가져온다. 류마티스활액조직은 혈관내막 대식세포와 섬유아세포양 활액세포의 숫자증가와 T세포, 세포질세포, 대식세포, 기타 활액내 세포들의 축적으로 특징 지워진다. 침투된 활액세포는 다양한 cytokine들, 대개 IL-1, IL-6, TNF-α등을 과잉생산하며, 고착분자와 단백질분해효소 (MMPs)의 유전자 발현등의 생산을 증가시킨다[16-18]. 이러한 요소들이 다른 염증세포의 유인과 활성화 및 연골과 골의 쇠퇴에 중요한 역할을 하며[19], 이들 cytokine의 활성도가 류마티스활막염의 여러양상인 활막조직염증, 활막액염증, 활막증식, 연골과 골의 손상 등과 깊은 연관성을 가지게 된다.

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 CSF등이 있다. 즉 RA조직에서 cytokine mRNA와 protein의 분석은 모든 환자에서 IL-1, IL-6, TNF-α, GM-CSF 등과 같은 proIFNlammatory cytokine과 IL-8과 같은 chemokine이 풍부하다[20-21].

MTX는 임상에서 폭넓게 사용되는 류마티스 관절염 치료제로 dihydrofolate(FH2)가 tetrahydrofolate (FH4)로 되는데 필수적인 dihydro folate reductase와 결합하여 FH4의 생성을 억압함으로써 세포의 정상적인 대사 과정이 저해되어 결국 DNA 및 RNA 합성의 억제 효과를 나타내는 엽산 유도체이다. 하지만 부작용으로는 간수치의 상승, 구내염, 오심, 설사나 가끔 탈모증이 생길 수 있다[22-23].

임상적으로 RA환자의 활액막(synovial membrane)은 비

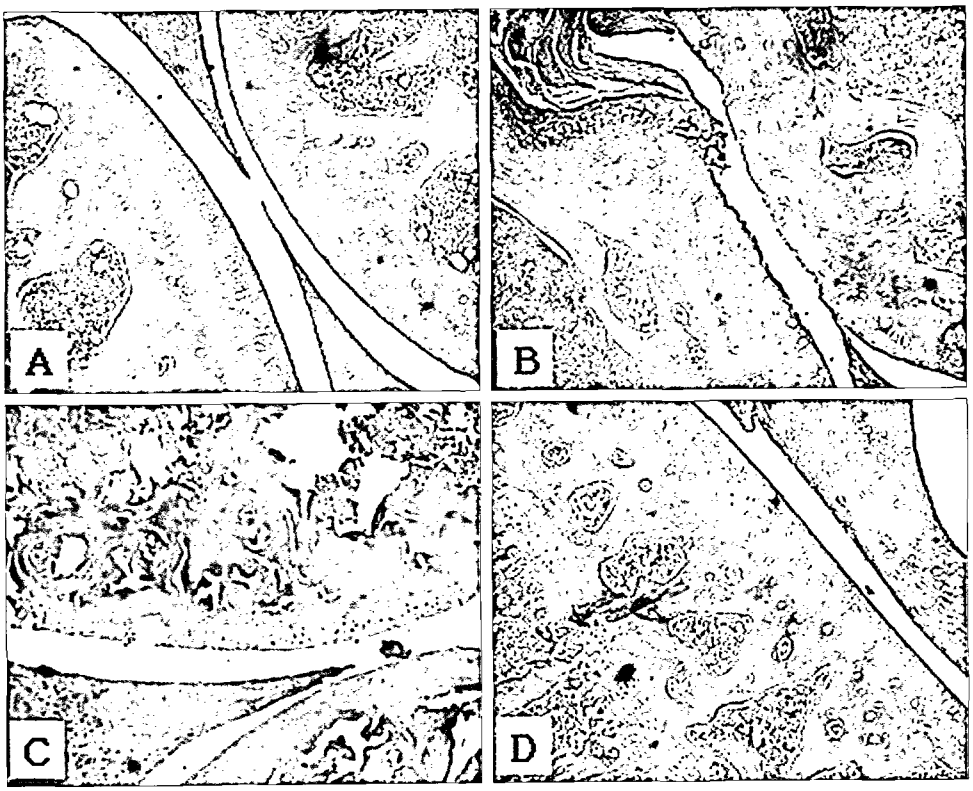

Fig. 6. Histological section of knee joints from CIA mice. DBA/1OlaHsd mice were immunized with 100 mg of bovine type II collagen (CII) on CFA on days 0 and 21. Group of 3 mice were treated with MTX, and SP for 30 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA. A, Normal (normal DBA/1OlaHsd mice). B, Control (Collagen-induction arthritis and no treatment). C, MTX(Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 0.3 mg/kg Methotrexate). D, SPP (Collagen-induction arthritis and intraperitoneal injection of 2 mg/kg Soyeum Pharmacopuncture solution). Masson-trichrome staining. Cross-sections of the Hindpaw from a Murine CIA. Original magnifications: X 20.

후, 신생혈관의 증가, 염증세포의 침윤 등의 특징이 있다. 이러한 과정 중에서 CD4+ T세포가 중요한 역할을 하는데, 활성화된 CD4+ T세포는 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF-α를 생산하고, 조직을 파괴하는 matrix metalloprotease(MMP)를 분비하며, IL-1, IL-6, TNF-α는 RA에서 염증을 유도하는 중요한 cytokine이다[24].

황련해독탕 (黃連解毒湯)은 중추신경과 교감신경이 흥분되어 혈액의 점도가 높으며, 혈소판응고 항진증, 혈관울혈증, 불안, 초조, 신경 정신이상, 고점도 혈증으로 인한 산소공급 저하에 주로 사용되며, 혈소판응고 항진을 억제하고 혈관의 염증성 출혈을 개선하며 조직세포와 뇌세포에 산소공급을 증진하며 항균작용과 항알러지작용을 하는 것으로 알려져 있다. 황련해독탕을 구성하는 약재는 황련 (黃連, Coptidis rhizoma), 황금 (黃芩, Scutellariae radix), 황백 (黃柏, Phellodendri cortex) 및 치자 (梔子, Gardeniae fructus)로, 황금은 항산화작용, 혈압강하작용, 고지혈증 개선작용, 진경작용 등의 약리작용이 연구되어 있고, 황련은 강심 항부정맥 작용, 혈압강하 작용, 혈소판응집 억제, 혈당강하 작용, 혈소판응집 억제, 혈당강하 작용 등의 약리작용이 알려져 있고, 황백은 혈압강하 작용, 항부정맥 장용 등이 연구되어 있으며, 치자는 혈압강하 작용, 글루타메이트 저해작용, 항산화작용 등이 알려져 있다. 지황 (地黃, Rehmannia glutinosa)은 뿌리의 생것을 생지황, 건조시킨 것을 건지황, 쪄서 말린 것을 숙지황이라고 하고, 혈당강하, 강심, 이뇨, 간기능보호, 항균작용이 보고되어 있으며, 그 중 생지황은 허약 체질 · 토혈 · 코피 · 자궁 출혈 · 생리불순 · 변비에 사용한다. 금은화 (金銀花, Lonicerae flos)는 항균작용, 항염증작용, 해열작용, 백혈구 탐식작용 증가, 중추신경 흥분작용, 혈청 콜레스테롤 강하, 궤양 예방효과 등이 보고되어 있으며, 대장염, 위궤양, 방광염, 인후염, 편도선염, 기관지염, 결막염 및 부스럼, 유행성 이하선염으로 인한 고열, 화농성 감염증 등에 응용한다. 포공영 (蒲公英, Taraxaci herba)은 억균작용, 면역기능강화, 담즙분비작용, 간기능보

호작용 및 이뇨작용이 보고되어 있으며, 종창, 유방염, 인후염, 옹종 (맹장염, 폐농양, 복막염), 안구충혈, 급성간염, 황달, 열로 인해 소변을 보지 못하는 증상에 주로 사용된다. 연교 (連翹, Forsythiae fructus)는 항균작용, 항염증작용, 혈압강하, 지혈작용, 간치료작용, 해열, 진토 및 이뇨작용이 보고되어 있으며, 종기, 반진, 맹장염, 폐농양, 림프절염, 인후염 등에 사용하고 이뇨 및 소염효과가 있다.

상기 약재들은 모두 소염에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 이는 일반적인 염증에 효과가 있는 것일 뿐, 이들이 관절염의 예방 또는 치료에 효과가 있다는 것은 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 CIA 동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 혈청내의 TNF-α 생성의 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 정상군(P<0.01), MTX군(P<0.01) 및 SPP군(P<0.01)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 소염약침액 처치군에서 MTX처치군보다는 그 감소효과가 적었지만 대조군에 비하여 통계적으로 유효한 감소를 보여 조직파괴를 유도하는 TNF-α 생성을 억제함을 관찰 할 수 있었다.

Interferon(IFN)에는 α,β,γ의 3종류가 있는데 IFN-α는 백혈구에서 생성되고, IFN-β는 바이러스 감염 섬유아세포에서 생성되며, IFN-γ는 활성화된 T림프구에서 생성된다. 그중 IFN-γ는 면역계에 가장 중요한 역할을 하며, Th1 cell, Tc cell, NK cell이 B cell과 macrophage를 활성화하여 포식된 미생물을 사멸하게 하는 cytokine으로 염증반응의 시작과 유지에 작용하고, 모든 염증반응을 확대하여 증폭하는 분자에 부착하여 세포표면의 발현을 돕는다[25].

본 연구에서는 th1 세포 자가면역질환 동물인 CIA동물 모델에 4주간 MTX와 소염약침액을 처치한 후 비장세포를 배양한 배양 상층액내의 IFN-γ 생성의 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 정상군(P<0.05), MTX군(P<0.01) 및 SP군(P<0.01)에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3). 이로 보아 소염약침액처치가 MTX처치군과 비슷한 수준으로 Th1림프구로 인한 자가면역질환을 억제하고, 또한 marcropahge의 활성화를 억제함이 관찰되어 이는 앞의 TNF-α 생성을 억제한 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 또한 이러한 결과들은 collagen type II에 대한 비장세포의 증식을 관찰한 결과와도 같은 양상을 보였는데, SPP 처치군(P<0.05)이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 소염약침액처치로 th1 우의 자가면역질환 동물인 CIA 관절염 생쥐에서 IFN-g를 생산하는 활성 th1세포 억제하여 염증질환을 치료하는 효과를 관찰할 수 있었다. 이는 활성 th1세포가 관절의 활막세포를 공격하고 대식세포를 자극하여 염증을 유발하는데, 소염약침액처치군에서 TNF-α의 혈청내 수준이 억제된 것으로 보아 관절염 억제에 효과를 보인 것으로 생각된다. 그리고 활성 비장세포 증식도 대조군에 비하여 소염약침액처치군이 억제된 것으로 보아 상기의 결과와 일치하는 결론을 얻었다.

RA 초기의 조직학적 소견은 미세혈관의 손상과 조직의 부종, 활막세포의 증식과 혈관주위의 림프구 침윤, 혈관형성, 등이며, 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연접부의 침식에 의해 발생하여 관절의 변형의 원인이 된다.

본 연구에서는 관절조직의 구조를 관찰하기 위하여 H&E 염색법을 이용하였고, Collagen fiber(교원섬유)의 축적정도를 관찰하기 위하여 M-T 염색을 통하여 관절(joint)조직을 관찰한 결과, 정상군에서는 관절강과 활막에 손상이 없는 것을 관찰할 수 있었으나(Fig 5A, 6A), 대조군에서는 관절염 유발에 의하여 임상증상과 유사한 관절의 침윤, 활막의 손상, 활막조직의 비후 및 연골의 침식등이 관찰되었다(Fig 5B, 6B). 이에 비하여 SPP 처리군(Fig 5D, 6D)에서는 MTX처리군(Fig 5C, 6C)과 비슷하게 관절강과 활막손상 및 연골의 침식이 정상군에 가깝게 적음을 관찰 할 수 있었다.

위의 연구 결과들을 종합해보면 소염약침액의 처치가 MTX처치에 가깝게 염증과 관련한 TNF-α와 IFN-γ를 억제하며, 비장세포 증식을 감소시킴을 관찰 할 수 있었으며 이는 조직학적 방법을 통하여 육안으로 관절강내를 관찰함으로서 소염약침액의 항 염증효과를 확인할 수 있었다. 이로 보아 새로운 한방적 치료방법인 소염약침액처치가 류마티스 관절염 치료제로 응용될 수 있는 가능성을 예측할 수가 있었다.

앞으로 이를 바탕으로 소염약침액 처치가 다양한 염증성 사이토카인들의 분비 경로와 그 정도간의 상관관계 및 소염약침액 각각의 구성에 대한 심도 있는 연구가 더 진행 되어져야 할 것으로 사료되어진다.

參考 文獻

1. Maini RN, Zvaifler NJ. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy. Rhematology P.3.3.2, London, Mosby, 1994
2. Gary S. Firestein. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423: 356-361, 2003
3. Carson DA, Chen PP, Kipps TJ. New roles for

rheumatoid factor. J Clin Invest 87: 379-383, 1991
4. Tighe H, Chen PP, Tucker R, et al. Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rhematoid factor autoantibody in transgenic mice. J Exp Med 177: 109-118, 1993
5. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nat Rev Drug Discov 2(6): 473-488, 2003
6. Aletaha D, Smolen JS. DMARD use in early rheumatoid arthritis. Lessons from observations in patients with established disease. Clin Exp Rheumatol Sep-Oct; 21(5 Suppl 31): S169-S173, 2003
7. Ten Wolde S, Breedveld FC, Hermans J, Vandenbroucke JP, van de Laar MA, Markusse HM, Janssen M, van den Brink HR, Dijkmans BA. Randomised placebo-controlled study of stopping secondline drugs in rheumatoid arthritis. Lancet 10; 347 (8998): 347-352, 1996
8. Simon LS. DMARDs in the treatment of rheumatoid arthritis: current agents and future developments. Int J Clin Pract 54: 243-249, 2000
9. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu Rev Immunol 19: 163-196, 2001
10. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet 358: 903-911, 2001
11. 이진훈 : 계혈등의 항염활성효과, 강원대학교 석사학위논문, 1999
12. 김병수 : 玄胡索. 赤芍藥. 紅花 混合藥鍼液이 關節炎 白鼠의 炎症과 肝에 미치는 影響, 경원대학교 석사학위논문, 2004
13. 조영주 : 희첨이 炎症性 사이토카인 및 류마티스양 關節炎에 미치는 影響, 대전대학교 박사학위논문, 2003
14. 서형식. 소염약침액이 staphylococcus aureus와 staphylococcus epidermidis에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. 대한약침학회지, 9(2):73-77, 2006
15. 서형식. 소염약침액, 황련해독탕, 황련이 staphylococcus aureus에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. 대한약침학회지, 9(2):87-92, 2006, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet 358: 903-911, 2001
16. Oligoglycosides, notoginsenosides-A, -B, -C, and -D, from the dried root of Panax notoginseng (Burk.) F.H. Chen. Chem Pharm Bull 45 : 1039-1045, 1997.
17. Kim DS, Chang YJ, Zedk U, Zhao P, Liu YQ, Yang CR. Dammarane saponins from Panax ginseng. Phytochemistry 40(5): 1493-1497, 1995
18. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer 26(2): 171-176, 1980
19. Lenardo MJ, et al. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. Nature. 353(6347): 858-861, 1991
20. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 14: 397-440, 1996
21. 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
22. Weinblatt ME. Toxicity of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1985 ; 12 : 35-9
23. American college of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for monitoring drug therapy in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1996; 39 : 723-31
24. 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
25. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1982 : 1-25, 229-46.