

동충하초 추출물이 콜라겐으로 유발된 관절염 생쥐 모델에 미치는 영향

신미경^{#1}, 노성수¹, 서영배^{1*}

대전대학교 한의과대학 본초학교실

Research on Effects of Cordyceps Sinensis in Collagen Induced Arthritis Mouse Model.

Mi-Kyung Shin^{#1}, Seong-Soo Roh¹, Young-Bae Seo^{1*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University Daejeon 300-716, Korea

ABSTRACT

Objectives : We examined to know the effect of Cordyceps sinensis(CS) on arthritis mouse induced by type II collagen.

Methods : To analyse immunomodulatory effects of CS, arthritis index, incidence, hind paw edema, DTH, spleen weight, the number of hemocytes, and surface-receptor expression of CD4+, CD8+ and CD19+ cells in DBA/1J mice which is experimental model of arthritis induced by collagen were measured in vivo.

Results : CS reduced arthritis index, incidence, hind paw edema and DTH significantly as compared with the control group in experimental model of arthritis induced by collagen. CS enhanced the spleen weight significantly as compared with the control group but didn't enhanced the number of leukocytes and thrombocytes in experimental model of arthritis. CS enhanced the number of activating cells and surface-receptor expression of CD4+, CD8+ cells as compared with the control group but didn't enhanced those of CD19+ cells in experimental model of arthritis.

Conclusion : We found out that CS may have a suppressing effect against auto-immune disease and will be need continuous research in looking for the more effective mechanism in the future.

Keywords : Cordyceps sinensis, Collagen II, Arthritis

* 교신저자 : 서영배, 대전대학교 한의과대학

·Tel : 042-280-2625 ·E-mail : genin@dju.ac.kr

제 1저자 : 신미경, 대전대학교 한의과대학

·Tel : 042-280-2640 ·E-mail : ddede@dju.ac.kr

·접수 : 2007년 8월 23일 ·수정 : 2007년 9월 17일 ·채택 : 2007년 9월 21일

서론

冬蟲夏草는 補陽藥으로 子囊菌綱 麥角菌目 麥角菌科에 속하는 冬蟲夏草菌 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.)이 蝙蝠蛾科 昆蟲의 幼蟲을 寄主로 하여 형성된 子實體(子座) 및 幼蟲의 屍體이다^{1~2)}.

류마티스 관절염은 한의학에서 痺證의 범주에 속하는데³⁾, 원인은 食傷, 勞倦, 痰飲, 瘀血 등으로 氣血不足, 精氣虛弱의 상태에서 風寒濕熱邪가 침입하여 발생하며^{4,5)}, 治法은 허약한 환자의 경우 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝하는 한약제를 응용하고 있다⁶⁾. 따라서 冬蟲夏草는 대표적인 滋養強壯劑로, 腎의 精氣가 虛해서 생긴 여러 증상에 응용되고 있고, 腰膝酸痛에 다용되고 있으며, 이러한 증상은 痺證의 범주에 속한다. 따라서 冬蟲夏草가 류마티스 관절염에 효과가 있을 것으로 생각되어, 자가 면역질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 冬蟲夏草의 가능성을 살펴보고자, in vivo 에서 류마티스 관절염의 실험적 모델인 DBA/1J 생쥐의 collagen induced arthritis (CIA)에 대하여 arthritis index와 incidence 측정, hind paw edema 측정, 지연형 과민반응(DTH) 측정, 비장무게 측정, 혈구세포 수의 변화 측정, CD3^{ε+}, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 세포 수 변화를 측정 등을 한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 한국화학연구소에서 구입한 BALB/C 4주령 숫컷 생쥐와 Charles River (Japan)으로부터 분양받은 DBA/1J 6주령 생쥐를 분양 받아 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물사육실의 조건은 22±2°C에서 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1%, 조지방 8.0%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물 및 추출물 제조

실험에 사용된 冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.)는 1997년 8월 中國 安國市 약재시장에서 구입 한 것을 질소 충전 진공포장하고, 온도

4°C 저온창고에서 보관 후 실험전 다시 정선한 것만을 사용하였다. 冬蟲夏草 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기 (Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조된 冬蟲夏草 추출물 (*Cordyceps sinensis* Sacc. extract (CSE))을 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Cordycepin, diethyl pyrocarbonate (DEPC), cyclophosphamide (CTX), collagen type II (CII), complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma (USA)사 제품을 사용하였으며, 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-CD3^ε, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD28, Propidium Iodide (PI) 및 RNase는 Pharmingen (USA)사 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 원심분리기 (Sigma, USA), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Turbo Thermal cycler™ (Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision 과학) 및 homogenizer (OMNI, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) Collagen 유발 생쥐의 관절염 억제 효과

(1) 관절염 유발과 시료투여

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 μg를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 10마리씩을 한 군으로 하여 대조군, 양성대조군 (cytoxin), 冬蟲夏草 투여군 (CSE) 3개 군으로 나누었다. cytoxin는 CII 1차 (0 day)와 2차 (21 day) 접종할 때 2회 주사하였고 冬蟲夏草 추출액은 CII 1차 접종 후 5주 (35일)간 1일1회씩 경구 투여하였다.

(2) Arthritis index (AI) and incidence 측정

2차 CII 접종 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발 (paw)에서 관절염 징후를 0 = no arthritis, 1 = small degree of arthritis, 2 = light swelling, 3 = medium swelling, 4 = severe swelling, 5 = severe swelling and non-weight-bearing 등으로 구분한 뒤, 각 4개의 발에 각 등급에 따라 0~5점까지 점수를 부여 하고, CIA 유발 정도를 1주일 간격으로 기록하였다. 그리고 실험상의 오차범위를 줄이기 위하여 3 등급과 5 등급의 측정을 하지 않고, 각각의 측정일에 계산된 발병수치의 합산을 4 등급의 최고점인 160점으로 나눈 비율로 발병율(incidence, %)을 결정하였다.

(3) Hind paw edema 측정

CII 접종 전과 후에 뒷다리의 부종치를 digital thickness gauge (Digimatic indicator IDC543-107F B, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan)로 왼쪽과 오른쪽 같은 부위를 2회 측정한 후 평균치를 사용하였다. 부종치는 뒷다리 두께 (paw Th, mm)로 표현하였다.

(4) 지연형 과민반응 (Delayed-Type Hypersensitivity reaction, DTH) 측정

1차 CII 접종 후 49일에 실험을 종료하고 오른쪽 귀 (ear)의 두께를 digital thickness gauge로 측정한다. CII (0.4 mg/ml) 25 μ l를 D-PBS에 녹인 후 오른쪽 귀의 피내에 주사하였다. 24시간 후 같은 부위의 오른쪽 귀의 두께를 측정한다.

(5) 비장무계와 혈구세포 수 변화 측정

1차 CII 접종 후 49일에 실험을 종료한 후 비장무계와 혈구세포 (WBC, Platelet) 수를 측정하였다.

(6) CD3e+, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 측정

DBA/1J 분리한 비장세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)로 CD4+, CD8+, CD19+ 세포를 분석하였다.

(7) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정 하였다.

결 과

1. Collagen에 의해 유발된 생쥐의 관절염 억제효과

1) 冬蟲夏草에 의한 관절염 발병억제와 hind paw edema 효과 분석

대조군은 booster 주사 (21일째) 후 부터 CIA가 나타나기 시작 하여 28일, 35일, 42일, 49일째의 발병율은 각각 15%, 58%, 95%, 93%로 나타났다.

CTX 투여군의 28일, 35일, 42일, 49일째 발병율은 각각 0%, 15%, 20%, 22%로 대조군에 비하여 15%, 43%, 75%, 71% 등의 현저한 억제 효과가 나타났다.

CSE 투여군은 28일, 35일, 42일, 49일째에 각각 5%, 34%, 45%, 44%의 발병율이 나타나 대조군에 비하여 10%, 54%, 50%, 49% 등의 발병율 억제가 나타났다(Fig. 1).

대조군은 booster 주사(21일째) 후 부터 부종이 급격하게 나타나기 시작하였는데 28일, 35일, 42일, 49일째에 각각 1.8 \pm 0.02mm, 2.2 \pm 0.03mm, 2.4 \pm 0.024mm, 2.5 \pm 0.07mm 등으로 측정 되었다.

CTX 투여군은 28일, 35일, 42일, 49일째에 각각 1.65 \pm 0.025mm, 1.68 \pm 0.03mm, 1.74 \pm 0.029mm, 1.75 \pm 0.053mm 등으로 유의성 있게 억제 되었다.

CSE 투여군은 28일, 35일, 42일, 49일째에 각각 1.65 \pm 0.026mm, 1.7 \pm 0.045mm, 1.84 \pm 0.052mm, 1.83 \pm 0.045mm 등으로 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 1).

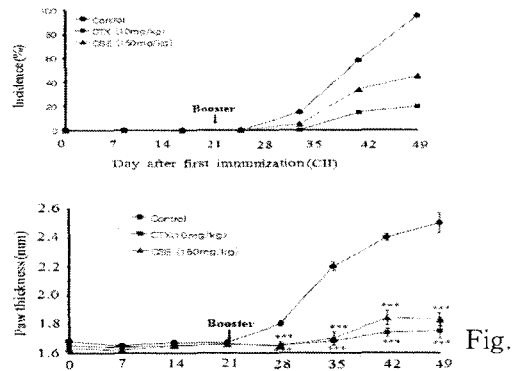


Fig.1. Prophylactic Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) and Cyclophosphamide (CTX) on the Incidence and Paw Thickness in Arthritis Murine Induced by Collagen. DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of type II collagen on CFA on days 0 and 21.

Each sample group was orally administrated by CSE (p.o, 150 mg/kg) or CTX (i.p, 10 mg/kg) for 48 days beginning on the day after the first immunization. Each point represents the mean of 10 mice. Hind paw Th was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean± S.E of 10 mice. Statistically significant value was compared with control data by Student's t-test (**p<0.001).

2) 冬蟲夏草에 의한 관절염 지표(arthritis index) 효과 분석

관절염 지표는 48일째 실험 종료 후 볼 수 있었는데 대조군의 AI는 7.7±0.22로 나타났고, CTX 투여군은 0.46±0.12로 나타나 거의 완전한 94.1%의 억제 효과가 나타났다. CSE 투여군에서는 3.4±0.51로 55.9%의 유의성 있는 억제효과가 나타났다(Fig. 2).

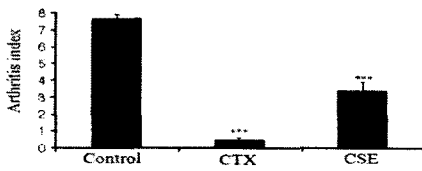


Fig. 2. Prophylactic Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) and Cyclophosphamide (CTX) on the Arthritis Index in Arthritis Murine Induced by Collagen.

DBA/1J mice were immunized with 100 µg of type II collagen on CFA on days 0 and 21. Each sample group was orally administrated of CSE (p.o, 150 mg/kg) or cyclophosphamide (i.p, 10 mg/kg) for 48 days beginning on the day after the first immunization.

The arthritis index (AI) was calculated from measurement taken the day after the final drug treatment. Each point represents the mean± S.E of 10 mice. Statistically significant value was compared with control data by Student's t-test (**p<0.001).

3) 冬蟲夏草의 DTH 효과와 비장무게변화 분석

지연형과민반응(DTH)으로 평가 결과, C II로 면역된 대조군은 정상군에 비하여 귀부종 (ear edema) 이 0.01±0.001 mm에서 0.31±0.02 mm로 증가되었고, cytoxan 투여군은 0.11±0.02 mm로 대조군에 비하여 41.9%의 유의성있는 억제가 나타났으며, CSE 투여군도 0.18±0.01 mm로 64.5%의 유의성있는 억제효과가 나타났다.

비장무게를 측정된 결과, 정상군은 0.147±0.004 g 인데 비하여 C II로 처리된 대조군은 0.132±0.009 g 으로 감소 되었다. cytoxan로 처리된 군은 0.259±0.0

13 g 으로 현저한 증가가 나타났다. CSE로 처리된 군은 0.169±0.013 g 으로 대조군에 비하여 20.5%로 유의성있는 증가가 나타났다.

정상군의 백혈구 수와 혈소판 수는 6.4±0.15x10³/mm³와 782±24.5x10³/mm³ 였으나 C II로 처리된 대조군은 10.2±0.21x10³/mm³와 832±28.1x10³/mm³로 증가되었다.

Cytoxan 처리군의 백혈구 수와 혈소판 수는 각각 4.1±0.18x10³/mm³와 41±20.4x10³/mm³로 현저한 감소가 나타났으나 이는 cytoxan에 의한 부작용으로 여겨진다.

CSE 처리군의 백혈구 수와 혈소판 수는 각각 8.1±0.20x10³/mm³와 702±19.7x10³/mm³로 유의성 있는 감소가 나타났다(Table 1).

Drugs	Dose (mg/kg)	N	Increase in ear Thickness (mm)	Inhibition (%)
Normal		10	0.01±0.001	
Control		10	0.31±0.02	
CTX	10	10	0.18±0.01***	41.9
CSE	150	10	0.11±0.02***	64.5

Drugs	Dose (mg/kg)	N	Change of spleen weight (g)	Increase (%)
Normal		10	0.147±0.004	
Control		10	0.132±0.009	
CTX	10	10	0.259±0.008***	96.2
CSE	150	10	0.169±0.013*	20.5

Drugs	Dose (mg/kg)	N	WBC (×10 ³ /mm ³)	Platelet (×10 ³ /mm ³)
Normal		10	6.4±0.15	782±24.5
Control		10	10.2±0.21	832±28.1
CTX	10	10	4.1±0.18***	41±20.4***
CSE	150	10	8.1±0.2***	702±19.7**

Table 1. Prophylactic Effects of Cordyceps sinensis extract (CSE) and Cyclophosphamide (cytoxan) on DTH Skin Reaction and spleen weight in Arthritis Murine induced by collagen.

DBA/1J mice were immunized with 100 µg of CII on CFA on days 0 and 21. Each sample group was treated with CSE (p.o, 150 mg/kg) or cytoxan (i.p, 10 mg/kg) for 48 days beginning on the day after the first immunization. Each sample group was injected with 10 µg of type II collagen in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. After 24 hrs, the thickness of the ear was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean± S.E of 10 mice. Statistically significant value was compared with control data by Student's t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4) 冬蟲夏草에 의한 CD4+, CD8+, CD19+ 세포 수 변화 분석

① CD4+ 세포 수의 변화

비장세포에서 대조군 (C)의 CD3ε+CD4+는 6.5%이었으나 CTX 처리군 (D)의 CD3ε+CD4+세포 수는 6.4%로 대조군에 비하여 큰 영향이 없었다.

CSE 처리군 (E, F)에서는 CD3ε+CD4+세포의 수가 6.9%와 7.5%로 면역세포의 증진이 관찰되었다 (Fig. 3-1).

비장세포에서 대조군 (C)의 CD3ε+CD8+은 1.80%이었으나 CTX 처리군 (D)의 CD3ε+CD8+세포 수는 0.17%로 대조군에 비하여 크게 감소하였다.

CSE 처리군 (E, F)에서는 CD3ε+CD8+세포의 수가 2.12%와 2.55%로 대조군에 비하여 면역세포 증진이 관찰되었다 (Fig. 3-2).

비장세포에서 대조군 (I)의 CD19+는 75.23%이었고 CSE 처리군 (II)의 CD19+세포의 수는 55.4%로 대조군에 비하여 26.42%의 면역세포 감소가 관찰되었다.

그러나 CTX 처리군 (III)의 CD19+세포 수는 18.3%로 대조군에 비하여 크게 감소되었다 (Fig. 3-3).

Cells of Arthritis Murine Induced by collagen.

DBA/1J mice were immunized with 100 μg of type II collagen on CFA on days 0 and 21. Each sample group was treated with CSE (p.o, 150 mg/kg) or cytoxin (i.p, 10 mg/kg) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 μg of type II collagen in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer.

Fig. 3-1: Events in panel (A) were backscattered onto a dot-plot of CD3ε+PE versus CD4+FITC. B, Not stain; C, Control; D, 10 mg/ml cytoxin; E-F, 150 mg/kg CSE were stained with CD3ε+PE/CD4+FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD4+ cells.

Fig. 3-2 : Events in panel (A) were backscattered onto a dot-plot of CD3ε+PE versus CD8+FITC. B, Not stain; C, Control; D, 10 mg/ml cytoxin; E-F, 150 mg/kg CSE were stained with CD3ε+PE/CD8+FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD8+ cells.

Fig. 3-3 : Events in panel (A) were backscattered onto a dot-plot of CD19+FITC. B, Not stain; C, Control; D, cytoxin (10 mg/kg) were stained with CD19+FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD19+ cells.

고찰

류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis : RA)은 교원성 질환의 일종으로 주로 다발성 관절염을 일으키는 전신 염증성 자가질환이며, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 동통이 초래되나, 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발된다⁷⁾.

한약재를 사용한 연구로 大羌活湯⁸⁾, 桂枝芍藥知母湯⁹⁾, 骨脂草¹⁰⁾, 秦朮¹¹⁾ 등의 CIA에 관한 보고가 있으며, Asano 등¹²⁾은 雷公藤에 의하여 DBA/1J 생쥐의 CIA에서 항체생성 및 CII에 대한 지연형 과민반응이 억제 되고, 관절염의 진행과 CII에 대한 면역반응이 억제 된다고 보고 하였고, Kobayashi 등¹³⁾은 辛夷에서 추출된 magnosalin에 의하여 IL-1α의 작용이 억제됨으로써 RA모델의 활액세포의 증식이 억제된다고 하였다.

동충하초의 약리작용은 매우 다양한 약리활성 성분에 의하여 나타나며, 특히 면역과 관련된 약리작용에서 면역증강 및 면역억제 등 서로 다른 약리효과를 보이고 있다.

冬蟲夏草에 관한 면역학적 실험연구로는 Chen 등

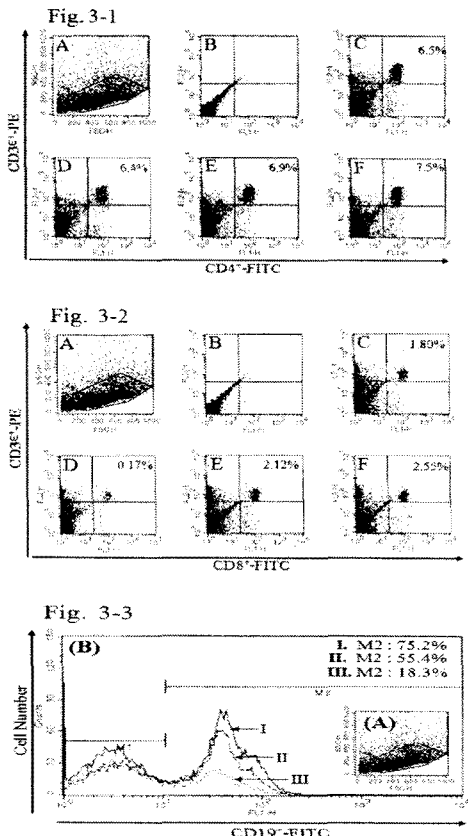


Fig. 3. Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) on the Expression of CD3ε+CD4+, CD3ε+CD8+ and CD19+ Cells in Spleen

14), 권상희 등¹⁵⁾, 정한솔 등¹⁶⁾, 최관준¹⁷⁾, 최정열¹⁸⁾, Kuo 등¹⁹⁾, Buenz 등²⁰⁾이 면역증강 및 면역억제에 대한 효능을 연구하였다. 따라서 면역결핍과 면역억제 환자에게 있어 면역증강제로 사용될 수 있으며, 피부이식과 장기이식 등의 이식요법과 면역계의 과잉 반응으로 나타나는 자가면역질환에 있어 면역억제제로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

이에 冬蟲夏草에 면역억제 작용이 있다는 점에 착안하여, 자가면역질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 冬蟲夏草의 가능성을 살펴보고자, in vivo 에서 류마티스 관절염의 실험적모델인 DBA/1J 생쥐의 collagen induced arthritis (CIA)에 대하여 arthritis index와 incidence 분석, hind paw edema 분석, 지연형 과민반응(DTH) 분석, 비장무게의 변화 분석, 혈구세포 수 변화 분석, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 세포 수 변화 분석을 하였다. 또한 in vitro 에서 BALB/C 생쥐의 배양된 비장세포의 활성화 분석, IL-12와 IFN- γ 유전자 발현 분석, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 세포 수 변화 분석 등을 시행 하였다.

CIA는 류마티스 관절염의 동물실험 모델로 개발되어 류마티스 관절염의 면역학적 기전의 연구와 치료약물의 약리 효과를 검사하는데 이용되는 방법중의 하나로, 조직학적으로는 증식성 염증성 관절염의 특징이 나타나 활막비대와 부활막 조직에 염증세포의 침착 및 세포의 관절염역으로의 유출, 경계 영역의 파괴, 골막염, 연골 표면의 단편화가 일어난다²¹⁻²⁴⁾.

CIA는 류마티스 관절염과는 달리 콜라겐을 주사하여 유도한 항원 유발성 자가면역질환 이기 때문에 류마티스 관절염에서 나타나는 피하결절, 폐섬유증상과 같은 합병증이 나타나지 않고 발병기간이 비교적 짧으며 rheumatoid factor가 검출되지 않는 등의 병리학적 및 면역학적 차이가 있지만, 류마티스 관절염에서와 마찬가지로 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 염증관련 cytokines들은 CIA진행에 결정적 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다^{21,22,24)}.

Cytokine은 수용성의 단백질 또는 당단백질이며 세포표면의 수용체에 결합해서 매우 소량으로 세포의 분화, 증식과 작용에 영향을 주는데, 이 중에서 백혈구와 백혈구 사이에서 signal을 전달하는 인자를 interleukine (IL)이라 한다^{25, 27)}.

TH 임파구는 생성하는 lymphokine 종류의 차이에 의해 다시 TH1과 TH2의 2가지 아집단으로 구분되며, TH 임파구에서 생성되는 interleukine은 지금

까지 연구된 보고에 의하면 IL-2, IFN- γ , lymphotoxin 등은 TH1 세포에서 생산되고 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등은 TH2 세포에서 생산되며, IL-3, TNF- α 및 GM-CSF 등은 TH1 및 TH2 모두에서 생산되는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁸⁾.

지연형 과민반응(DTH)은 TH1 임파구에 의해 활성화된 macrophage가 중심이 되어 나타나는 T 임파구에 의한 상해반응으로 IV형 알레르기에 속한다^{26,27)}.

DTH는 세균, virus, 진균 등에 감염된 사람과 동물에서 미생물 성분에 대한 지연형 피부과민반응으로서 관찰되는데, 결핵균에 감염된 사람의 tuberculin 반응이 그 예로써, 결핵균에 감염된 사람의 피부에 결핵균으로부터 추출된 tuberculin 또는 PPD (purified protein derivative of tuberculin)를 점적하면 발작, 종창을 중심으로 하는 피부반응이 서서히 나타나서 24-48시간 후에 반응이 최대가 된다^{26,27)}.

이 DTH는 항원으로 감염된 TH(TH1) 임파구가 동일한 항원으로 재차 자극되어 cytokine (IFN- γ)이 생성되고, 이 cytokine에 의해 활성화되는 macrophage의 작용이 중심이 되는 염증성 조직 상해이며, cytokine에 의한 직접적인 조직세포의 상해, 화학전달물질에 의한 혈관투과성의 항진도 이 상해에 관여한다^{26,27)}.

Adjuvant란 항원과 동시에 면역계에 작용시켜서 특이면역을 강화하는 물질을 말하며 일반적으로 면역 adjuvant라 부르는데, 이 중 실험동물에서 가장 광범위하게 사용되고 있는 것이 Freund의 adjuvant인데, 이것은 water in oil형의 emulsion내에 항원을 넣은 것으로서 결핵사균을 첨가한 완전 Freund adjuvant와 첨가하지 않은 불완전 Freund adjuvant가 있다^{26,27)}.

이러한 adjuvant는 항원을 국소에 장시간 머무르게 했다가 조금씩 방출시키거나 macrophage를 자극해서 그 항원 제시활성을 강화하는 작용을 가지고 있으며, Freund adjuvant를 사용해서 면역시키면 미량의 항원에 대해서 오래 지속하는 항체응답과 지연형 과민반응이 야기되는데, 이외에 일반적으로 면역응답이 유도되지 않는 자기항원에 대해서도 응답을 유도하므로 동물에 각종의 실험적 자가면역병을 유발한다^{26,27)}.

이러한 이론적 기반을 토대로 CIA를 중심으로 冬蟲夏草의 면역억제 효과를 실험적으로 입증 하고자 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

Collagen에 의해 유발된 생쥐의 관절염 억제에 대

한 冬蟲夏草의 효과를 살펴보기 위하여 관절염 발병 효과, hind paw edema 효과, arthritis index 효과, DTH 효과, 비장무게 측정, 혈구세포 수 변화, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 수의 변화 등을 측정 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

관절염 발병효과에서 CIA는 booster 주사 (21일째)후부터 나타나기 시작 하여 28일, 35일, 42일, 49일째의 발병율은 대조군이 각각 15%, 58%, 95%, 93%로 나타났고, CTX 투여군은 0%, 15%, 20%, 22% 등으로 15~71%의 현저한 억제효과가 나타났으며, 冬蟲夏草 투여군은 각각 10%, 54%, 50%, 49% 등으로 5~45% 의 억제 효과가 나타났다.

Hind paw edema는 booster 주사 (21일째)후부터 급격하게 나타나기 시작하여 28일, 35일, 42일, 49일째에 각각 1.8±0.02mm, 2.2±0.03mm, 2.4±0.024mm, 2.5±0.07mm 등으로 측정 되었고, CTX 투여군은 1.65±0.025mm, 1.68±0.03mm, 1.74±0.029mm, 1.75±0.053mm 등으로 유의성 있게 억제 되었으며, 冬蟲夏草 투여군도 각각 1.65±0.026mm, 1.7±0.045mm, 1.84±0.052mm, 1.83±0.045mm 등으로 유의성 있게 억제 되었다.

관절염 지표 (arthritis index)는 48일째 실험 종료 후 볼 수 있었는데 대조군은 7.7±0.22로 측정되었고, CTX 투여군은 0.46±0.12로 측정되어 거의 완전한 94.1%의 억제 효과가 나타났는데, 이는 관절염 억제 효과가 아닌 정상세포까지 사멸시키는 CTX의 부작용으로 판단 된다. 한편 冬蟲夏草 투여군은 3.4±0.51로 55.9%의 유의성 있는 억제효과가 나타났다.

DTH 효과에서 CII로 면역된 대조군은 정상군에 비하여 귀부종 (ear edema)이 0.01±0.001mm에서 0.31±0.02mm로 크게 증가 되었는데, CTX 투여군은 0.11±0.02mm로 대조군에 비하여 41.9%의 유의성 있는 억제가 나타났으며, 冬蟲夏草 투여군에서도 0.18±0.01mm로 64.5%의 유의성 있는 억제효과가 나타났다.

비장무게의 측정에서 정상군은 0.147±0.004g 인데 비하여 CII로 처리된 대조군은 0.132±0.009g 으로 감소 되었고, CTX 처리군은 0.259±0.013g 으로 현저한 증가가 나타났는데, 이는 정상 비장세포의 파괴로 인한 부종 때문으로 판단되며, 冬蟲夏草 처리군은 0.169±0.013g 으로 대조군에 비하여 20.5%으로 유의성 있는 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 冬蟲夏草에 비장세포 증진을 통한 면역증진 효과가 있음을 알 수 있으며, 冬蟲夏草 추출물 (Cs-Cr)이 비장무게를 증가시킨다는 보고³³⁾와 일치된다.

혈구세포 수 변화에서 정상군의 백혈구 수와 혈

소판 수는 6.4±0.15x10³/mm³와 782±24.5x10³/mm³ 였으나, CII로 처리된 대조군은 10.2±0.21x10³/mm³와 832±28.1x10³/mm³로 증가 되었다. CTX 처리군의 백혈구 수와 혈소판 수는 각각 4.1±0.18x10³/mm³과 441±20.4x10³/mm³로 현저한 감소가 나타났으나 이는 CTX에 의한 부작용으로 여겨지며, 冬蟲夏草 처리군의 백혈구 수와 혈소판 수는 각각 8.1±0.20x10³/mm³와 702±19.7x10³/mm³로 유의성 있는 감소가 나타났다.

CD4+ 세포 수의 변화에서 대조군의 CD3e+CD4+는 6.5%이었으나 CTX 처리군의 CD3e+CD4+세포 수는 6.4%로 대조군에 비하여 큰 영향이 없었으며, 冬蟲夏草 처리군의 CD3e+CD4+세포의 수는 6.9%와 7.5%로 증가되는 면역세포의 증진이 관찰되었다

CD8+ 세포 수의 변화에서 대조군의 CD3e+CD8+는 1.80%이었으나 CTX 처리군의 CD3e+CD8+세포 수는 0.17%로 대조군에 비하여 크게 감소 되었으며, 冬蟲夏草 처리군의 CD3e+CD8+세포의 수는 2.12%와 2.55%로 대조군에 비하여 면역세포 증진이 관찰 되었다.

이는 冬蟲夏草가 면역억제에 대하여 CD4+와 CD8+를 marker로 갖는 T helper 세포를 보호하는 것이라 여겨지며, 비장무게를 증가시키는 상기의 결과와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다. 또한 prednisolone acetate와 cyclophosphamide에 대하여 T helper 세포를 보호 한다는 보고³³⁾와 일치하는 경향을 나타내는 것이나, 면역학적으로 CD4+와 CD8+ 세포의 비율이 중요한 의미를 가지고 있기 때문에 이에 대한 보다 깊은 연구가 필요하다고 생각 된다.

CD19+ 세포 수 변화에서 대조군의 CD19+는 75.23%이었으나, CTX 처리군의 CD19+세포 수는 18.3%로 대조군에 비하여 크게 감소되었으며, 冬蟲夏草 처리군의 CD19+세포 수는 55.4%로 대조군에 비하여 26.42%의 면역세포 감소가 관찰되었는데, 이는 CD19+가 B 림프구의 marker로써 macrophage의 작용이 중심이 되는 DTH를 冬蟲夏草가 억제한다는 결과와 일치 되는 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과에서 冬蟲夏草가 CIA에서 발생하는 관절염 발병, hind paw edema, arthritis index, DTH, 백혈구 수와 혈소판 수, CD19+세포 수 등에 대하여 모두 유의성 있는 억제효과를 나타냈으며, CTX와 같은 면역 억제제에서 볼 수 없는 비장무게의 증가와 CD3e+CD4+ 세포 및 CD3e+CD8+ 세포 수를 증가 시키는 면역 증진을 나타내는 것으로 보아 안정적인 면역억제제로써 사용 될 수 있을 것으

로 생각 된다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 *in vivo* 에서 일치되는 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었고, 또한 면역증진작용도 함께 나타남을 확인 할 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

冬蟲夏草의 면역억제기능을 관찰하고자 *in vivo* 에서 류마티스 관절염의 실험적모델인 DBA/1J 생쥐의 CIA에 대하여 arthritis index 와 incidence 분석, hind paw edema 측정, DTH 측정, 비장무게 측정, 혈구세포 수의 변화, CD3e+, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 분석을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 冬蟲夏草 투여로 CIA DBA/1J 생쥐의 arthritis index와 incidence, hind paw edema, DTH 등은 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다.
2. 冬蟲夏草 투여로 CIA DBA/1J 생쥐의 비장무게는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었고, 백혈구 수와 혈소판 수는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.
3. 冬蟲夏草 투여로 CIA DBA/1J 생쥐의 CD4+, CD8+의 활성화세포수와 표면수용체 발현이 대조군에 비하여 증가되었으나 CD19+는 감소되었다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 *in vivo* 에서 일치되는 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었고, 또한 면역증진작용도 함께 나타남을 확인 할 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 顏正華 主編. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. 1991:776~9.
2. 中國藥物大典編纂委員會. 中國藥物大全(中藥券). 北京: 人民衛生出版社. 1991:339.
3. 전국한의과대학재활의학교실. 동의재활의학과

학. 서울: 서원당. 1995:95-6.

4. 黃文東 외. 실용중의내과학. 상해: 상해과학기술출판사. 1986:554-69
5. 강인수. 비증치료의 용약에 관한 소고. 대한한의학회지. 1990;11(1):245-52
6. 김기현. 비증. 서울: 정담출판사. 1993:23-9
7. 金穆鉉. 류머티양 관절염의 역학. 대한의학협회지. 1986;29(1):7~10.
8. 李吳根. 大光活湯이 第Ⅱ型 콜라겐 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 韓方物理療法科學會誌. 1994;4(1):87~97.
9. 申炳熙. 桂枝芍藥知母湯이 第Ⅱ型 콜라겐 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 韓方物理療法科學會誌. 1994; 4(1):121~31.
10. 嚴載元. 骨膽草가 第Ⅱ型-콜라겐 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 韓方物理療法科學會誌. 1995;5(1):149~59.
11. 김성재. 秦芫가 콜라겐 誘發 關節炎의 免疫反應에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1998;19(1):368~84.
12. Asano K, Matsuishi J, Yu Y, Kasahara T and Hisamitsu T. Suppressive effects of *Tripterygium wilfordii* Hook f., a traditional Chinese medicine on collagen arthritis in mice. *Immunopharmacology*. 1998;39(2):117~26.
13. Kobayashi S, Kobayashi H, Matsuno H, Kimura I and Kimura M. Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs containing magnosalin, a compound from 'Shin-i' (Flos magnoliae) on the proliferation of synovial cells in rheumatoid arthritis models. *Immunopharmacology*. 1998;39(2):139~47.
14. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS and Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*. 1997;60(25):2349~59.
15. 권상희, 우희중, 한대석, 김미경. 동충하초의 건분 및 물추출물이 흰쥐의 지방대사: 항산화 및 면역능에 미치는 효과. 한국영양학회지. 2001;34(3):271-84.
16. 정한술, 권진, 이태규, 이광규, 오찬호. 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):327-31.
17. 최관준. 동충하초 경구투여와 약침이 백서의 기관지평활근 장력과 염증 및 면역 반응에 미치는

영향. 동신대 대학원. 2003.

18. 최정열. 동충하초 및 상황버섯의 분류와 면역 활성화에 관한 연구. 대전대 대학원. 2002.

19. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF and Shiao MS. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. *Life sciences*. 2001;68(9):1067-82.

20. Buenz EJ, Weaver JG, Bauer BA, Chalpin SD and Badley AD. *Cordyceps sinensis* extracts do not prevent Fas-receptor and hydrogen peroxide-induced T-cell apoptosis. *J. of ethnopharmacology*. 2004;90(1):57-62.

21. Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;73(1):11~8.

22. Cooper WO, Fava, RA., Gates, CA., Cremer, MA. and Townes, AS. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol*. 1992;89(2):244~50.

23. Hom JT, Bendele AM and Carlson DG. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 1988; 141(3):834~41.

24. Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hamaoka T and Fujiwara H. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1989;32(5):594~600.

25. 中島 泉 著, 吳贊鎬 譯. 신면역학입문. 서울: 지구문화사. 1997:118,120,123,127~8,175~6,185~7,234.

26. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울: 서울대학교출판부. 1997: 100,114,117,122~31,179~80,253,255,262,266~69.

27. 서울대학교 의과대학편. 중앙학. 서울: 서울대학교출판부. 1992:188~9,228~9.

28. 타다토미오지 저, 황상익 역. 면역의 의미론. 서울: 하늘과학문고. 1998: 43,69,92.