大田大學校 韓醫學硏究所 論文集
第17卷 第2號 2008年 12月 31日

利濕活通湯이 關節炎 病態 動物모델에서 脾臟內 免疫細胞 變化에 미치는 影響

정우현·최학주·윤미영·김선빈·김동희*

The Effect of Esubwhaltongtang (ESWTT) on the changes of lymphocyte composition in spleen of collagen-induced arthritis mice model

Chung Woo-Hyun, Choi Hak-Joo, Yun MI-Young, Gim Seon-Bin, Kim Dong-Hee
Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

To investigate the effects of ESWTT on rheumatoid arthritis in collagen-induced arthritis mice model, the animals were orally administrated with the extract following by analyzing the changes of lymphocyte composition in spleen with flow cytometry.

These results suggest as follows;

1. ESWTT decreased the total cell number of spleen at 400 and 200 mg/kg about 41% and 32%, respectively.

2. ESWTT reduced the number of CD19+ cells in spleen at 400 and 200 mg/kg about 51% and 46%, respectively.

3. ESWTT down-regulated the number spleen CD3+ cells approximately 26% at 400 mg/kg-treated group.

4. ESWTT decreased the number of CD3+/CD69+ cells in spleen at 400 and 200 mg/kg about 79% and 76%, respectively.

5. ESWTT reduced the number of CD4+ and CD8+ cells in spleen, however, the results were not significant.

6. ESWTT decreased the number of CD4+/CD25+ cells in spleen at 400 and 200 mg/kg about 60% and 56%, respectively.

Taken together these results, ESWTT has an efficacy on rheumatoid arthritis through inhibiting the proliferation of lymphocytes such as B and T cells.

Key words : Esubwhaltongtang, collagen-induced arthritis

I. 緖 論

관절염은 전세계 인구의 12%, 60대 이상의 70%가 증상을 가지고 있는 대표적인 퇴행성 질환으로 매년 전 세계적으로 6600만명의 환자가 발생하며, 국내에서만 2백만명 이상의 환자가 이로 인하여 고통을 받고 있다.

이 중 류마티스관절염은 아직 정확한 발병 원인이 밝혀지지 않았으나, 관절 조직에 B 세포나 T 세포와 같은 림프구뿐만 아니라 다양한 면역

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.kr

세포들의 침윤이 일어난다는 점[1-3]에서, 자가면역질환의 일종으로 이해되고 있다. 관절 조직으로 침윤된 B 세포는 IgG와 같은 항체를 생산하여 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며[6], CD4+ 또는 CD8+ T cell은 병변 부위로 이동하여 IFN-ɣ나 TNF-α와 같은 염증성 사이토카인을 분비하는 병리적 작용을 한다[4-8]. 이러한 면역학적인 요인 이외에도 6번 염색체에 존재하는 MHC를 구성하는 HLA-DR4 유전자와의 연관성에 대한 논문[9]도 보고되어 유전적인 요인도 작용하는 것으로 알려지고 있다.

관절염 치료제로는 통증 완화를 기대할 수 있는 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)와 항염증과 치료 효능이 있는 부신피질호르몬제, 항류마티즘 약물 등이 있으나[10], 이들 약물들은 위궤양이나 위장관 출혈 등의 다양한 부작용이 나타나는 문제점이 있다[11]. 이외에도 COX-2 특이적 억제제인 celecoxib나 rofecoxib와 같은 약물[12]과 염증 반응 관련 인자인 TNF-α나 IL-1과 같은 사이토카인을 억제시켜 관절염을 치료하는 약물 등이 개발되었으나[13, 14], 이 역시 위장관 독성, 혈전 생성 위험율 증가[15, 16]및 고가의 치료제라는 단점을 가지고 있다.

류마티스관절염은 中醫學에서 '類風濕性關節炎'으로 언급되고 있으며, 타 관절염과 마찬가지로 "痺證"의 범주로 이해되고 있다[17-21]. 寒冷, 濕, 疲勞, 創傷, 精神刺激, 營養不良 등이 主 病因으로, 이들이 단독 혹은 相互 錯雜하여 經絡과 관절의 氣血循環 장애를 초래하며, 이러한 氣血不暢은 痰飮과 瘀血의 이차적 병리산물을 유발한다. 특히 痰瘀의 互結은 관절의 腫大, 畸形, 强直 등을 초래함으로써 심각한 후유증을 남기게 된다. 따라서 최근 임상에서는 이들의 치료를 위해 다양한 祛痰化瘀 약물들을 가미한 처방이 응용되고 있으며[17-21], 실험을 통하여 鎭痛, 消炎에 대한 효능이 보고[22, 23]되고 있다.

본 시료인 利濕活通湯 (ESWTT)은 土茯苓, 萆薢 등의 淸熱利濕藥을 중심으로 地龍, 赤芍藥 등의 活血化瘀 약물이 가미되어 주로 濕熱과 瘀血로 인한 관절염에 광범위하게 활용되고 있는 臨床方이다. 특히 구성 약물중 土茯苓, 牛膝, 黃栢, 赤芍藥, 忍冬藤, 虎杖根, 防己 등은 실험적으로 이미 본 연구와 관련된 免疫調節作用[24-26]과 抗關節炎效果[27-29]가 규명된 바가 있으며, 임상에서는 본 시료와 유사한 구성으로 이루어진 抗關節炎 처방이 환자의 관절 증상 개선과 더불어 併發되는 다양한 증상에 유의적인 효과가 있음이 보고[17-20]된 바가 있다.

이에 본 실험에서는 류마티스관절염 치료제 개발을 위한 EBM 구축 단계로, 현재 임상에서 활용되고 있는 利濕活通湯(ESWTT)의 면역학적 효능을 객관적으로 규명하고자 관절염 병태 동물모델에서 비장에 존재하는 면역세포 변화를 살펴보았다.

Ⅱ. 實 驗 方 法

1. 재 료

1) 동 물

실험 동물은 폴라스인터내셔날 (England)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J mouse를 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) 약 재

본 실험에 사용한 利濕活通湯 (ESWTT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 2첩 (貼)의 내용과 분량은 아래와 같다.

Table 1. The Composition of Esubwhaltongtang (ESWTT)

韓藥名	生 藥 名	(g)
土茯苓	Smilacis Glabrae Rhizoma	30
葦 薤	Tokoro Rhizoma	30
川牛膝	Achuranthis Radix	30
蒼 朮	Atractylodis Rhizoma	30
黃 柏	Phellodendri Cortex	30
威靈仙	Clematidis Radix	30
地 龍	Lumbricus	30
赤芍藥	Paeoniae Radix	30
甘 草	Glycyrrhizae Radix	30
忍冬藤	Lonicerae Folium	30
虎杖根	Et Rhizoma Reynoutriae Radix	15
防 己	Cocculi, Stephaniae Radix	10
	Total amount	325

3) 시약 및 기기

Bovine typeⅡ collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate, heparin, ACK, ethyl ether, collagenase, RPMI-1640, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, Avidin-HRP conjugeted antibody는 R&D systems 사 (U.S.A) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, FITC-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti -CD25, FITC-anti-CD69, FITC-anti-CD49b는 Pharmingen사 (San Diego, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), centrifuge (Centrikon, Sigma), Bio-freezer (Sanyo, Japan), heating block, ice-maker (Vision, Korea), CO2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001, Korea), vacuum pump, rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), autoclave (Hirayama, Japan), plate shaker (Lab-Line, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

ESWTT 2첩 분량에 각각 증류수 2, 000 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치 (Rotary evaporator, BuCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조 (21.2 g) 한 후, 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 류마티스 관절염 생쥐 (CIA) 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type Ⅱ collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 ㎍를 DBA/1J 생쥐 둔부에 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 ESWTT 투여군으로 나누었다.

3) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 6 마리씩을 한 군으로 하여 정상군 (WT), 대조군 (Control-CT), 그리고 methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) 처리군, ESWTT 처리군으로 나누어 실험 시작, 3주후부터 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)는 매일 1회 각각 0.1 ml 씩 복강주사 하였으며, ESWTT (400, 200 mg/kg) 처리군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) 비장의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 비장을 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하였다. 이를 D-PBS로 5분간 원심분리(1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이것을 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (Absolute number)를 산출하였다.

5) 형광 유세포 분석

DBA/1J 생쥐에서 비장을 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC- anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, 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 절대세포수 (Absolute number)를 산출하였다.

6) 통계처리

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

Ⅲ. 實 驗 結 果

1. 비장의 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 4주간 ESWTT를 경구 투여한 후 비장에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, 정상군이 9.10 ± 1.10 (x107), 대조군이 17.20 ± 1.00 (x107), MTX 투여군이 15.20 ± 1.80 (x107), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 10.20 ± 1.2 (x107), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 11.70 ± 1.5 (x107)로 나타나 400, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01, *p<0.05) 있는 감소를 나타내었다 (Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of ESWTT on Total Cell Number of Spleen in CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
Total cell number (x10 7)	9.10 ± 1.10	17.20 ± 1.00+++	15.20 ± 1.80	10.20 ± 1.2**	11.70 ± 1.5*

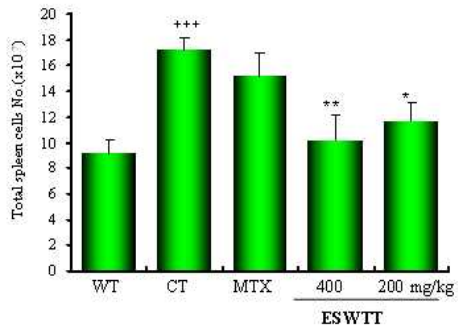

Fig. 1. Effects of ESWTT on total spleen cell number in CIA mice. WT (Normal), CT (Control), MTX (0.3 mg/kg), ESWTT (200 mg/kg or 400 mg/kg). Statistically significant value compared with WT (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT (**p<0.01, *p<0.05).

2. 비장내 면역세포에 미치는 영향

1) CD19+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD19+ 세포수를 절대 세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 43.2 ± 8.9 (x106), 대조군이 118.4 ± 5.9 (x106), MTX 투여군이 81.4 ± 8.9 (x106),

ESWTT 400 mg/kg 투여군이 58.2 ± 2.3 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 64.3 ± 3.1 (x106)로 나타나, 400, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001, ***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다 (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD19+ Cells in Spleen of CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD19+ (x106)	43.2 ± 8.9	118.4 ± 5.9+++	81.4 ± 8.9**	58.2 ± 2.3***	64.3 ± 3.1***

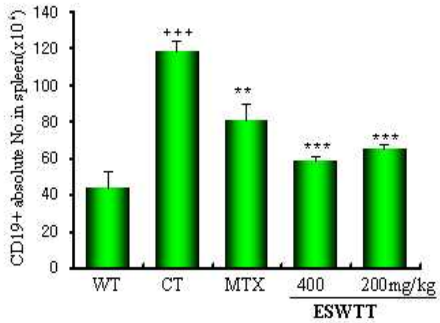

Fig. 2. Effects of ESWTT on absolute number of CD19+ cells in spleen of CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD19 antibody and analyzed by flow cytometery. Statistically significant value compared with WT (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

2) CD3+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD3+ 세포수를 절대 세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 37.4 ± 2.9 (x106), 대조군이 44.2 ± 2.2 (x106), MTX 투여군이 52.9 ± 3.1 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 32.9 ± 1.8 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 39.6 ± 1.8 (x106)로 나타나, 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (**p<0.01) 있는 감소를 나타내었다 (Table 4, Fig. 3).

Table 4. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD3e+ Cells in Spleen of CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD3+ (x106)	37.4 ± 2.9	44.2 ± 2.2	52.9 ± 3.1*	32.9 ± 1.8**	39.6 ± 1.8

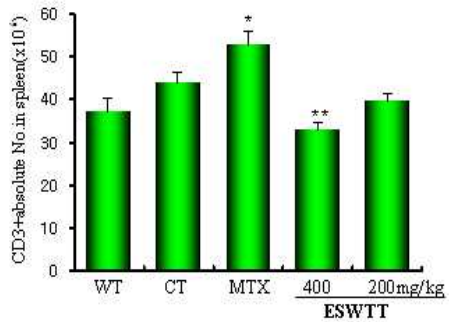

Fig. 3. Effects of ESWTT on absolute number of CD3+ cells in spleen of CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3 antibody and analyzed by flow cytometery. Statistically significant value compared with CT (*p<0.05, **p<0.01).

3) CD3+/CD69+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD3+/CD69+ 세포수를 절대 세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 4.5 ± 0.04 (x106), 대조군이 23.5 ± 1.5 (x106), MTX 투여군이 4.7 ± 1.3 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 4.9 ± 1.3 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 5.7 ± 1.7 (x106)로 나타

나 400, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001, ***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다 (Table 5, Fig. 4).

Table 5. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD3+/CD69+ Cell of Spleen in CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD3+/CD69+ (x106)	4.5 ± 0.04	23.5 ± 1.5+++	4.7 ± 1.3***	4.9 ± 1.3***	5.7 ± 1.7***

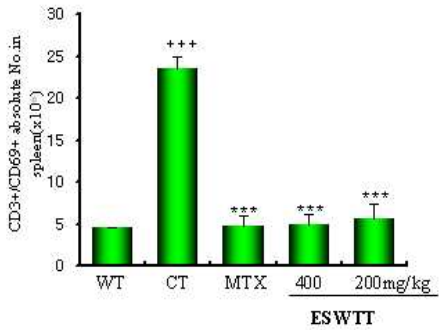

Fig. 4. Effects of ESWTT on absolute number of CD3+/CD69+ cell of spleen in CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD69 antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with WT (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT (***p<0.001).

4) CD4+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD4+ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 20.5 ±2.4 (x106), 대조군이 21.8 ± 4.4 (x106), MTX 투여군이 30.6 ± 3.1 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 15.6 ± 3.0 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 19.1 ± 3.0 (x106)로 나타났다 (Table 6, Fig. 5).

Table 6. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD4+ Cells of Spleen in CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD4+ (x106)	20.5 ± 2.4	21.8 ± 4.4	30.6 ± 3.1	15.6 ± 3.0	19.1 ± 3.0

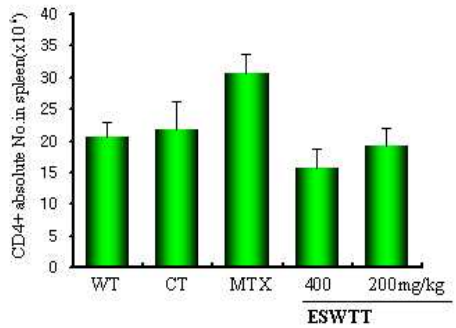

Fig. 5. Effects of ESWTT on absolute number of CD4+ cells of spleen in CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks adminis -tration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4 antibody and analyzed by flow cytometery.

5) CD4+/CD25+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수 (absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 0.6 ± 0.2 (x106), 대조군이 4.8 ± 0.3 (x106), MTX 투여군이 1.7 ± 0.2 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 1.9 ± 0.4 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 2.1 ± 0.2 (x106)로 나타나 400, 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001, ***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다 (Table 7, Fig. 6).

Table 7. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD4+/CD25+ Cells in Spleen of CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD4+/CD25+ (x106)	0.6 ± 0.2	4.8 ± 0.3+++	1.7 ± 0.2***	1.9 ± 0.4***	2.1 ± 0.2***

Table 8. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD8+ Cells in Spleen of CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD8+ (x106)	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.3

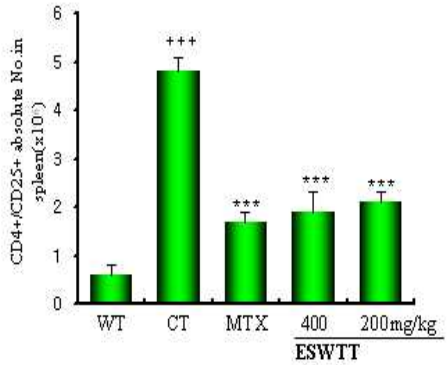

Fig. 6. Effects of ESWTT on absolute number of CD4+/CD25+ cells in spleen of CIA mice. Spleen cells (106cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4 and PE-conjugated anti-CD25 antibody and analyzed by flow cytometery. Statistically significant value compared with WT (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT (***p<0.001).

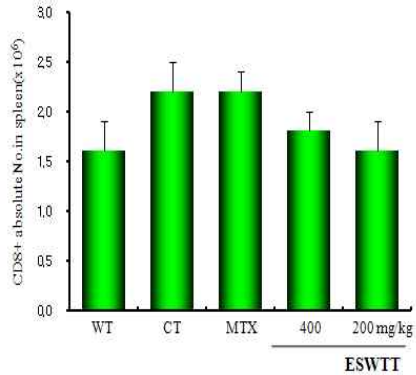

Fig. 7. Effects of ESWTT on absolute number of CD8+ cells in spleen of CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks admini- stration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD8 antibody and analyzed by flow cytometery.

6) CD8+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD8+ 세포수를 절대 세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 1.6 ± 0.3 (x106), 대조군이 2.2 ± 0.3 (x106), MTX 투여군이 2.2 ± 0.2 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 1.8 ± 0.2 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 1.6 ± 0.3 (x106)으로 나타내었다 (Table 8, Fig. 7).

7) CD49b+ 발현에 미치는 영향

비장내 CD49b+ 세포수를 절대 세포수(absolute number)로 산출한 결과, 정상군이 5.7 ± 0.4 (x106), 대조군이 5.9 ± 0.8 (x106), MTX 투여군이 8.7 ± 0.8 (x106), ESWTT 400 mg/kg 투여군이 3.74 ± 0.2 (x106), ESWTT 200 mg/kg 투여군이 6.1 ± 0.4 (x106)로 나타나, 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Table 9, Fig. 8).

Table 9. Effects of ESWTT on Absolute Number of CD49b+ Cells of Spleen in CIA Mice

	WT	CT	MTX	ESWTT	
				400 mg/kg	200 mg/kg
CD49b+ (x106)	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.8	8.7 ± 0.8	3.74 ± 0.2*	6.1 ± 0.4

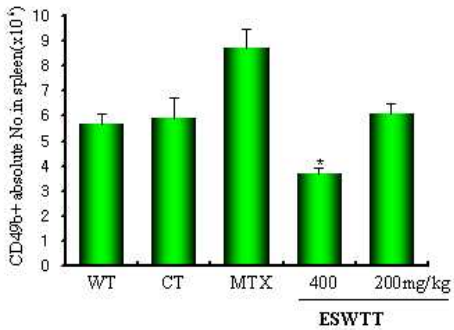

Fig. 8. Effects of ESWTT on absolute number of CD49b+ cells of spleen in CIA mice. Spleen cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of ESWTT. The cells were incubated with FITC-conjugated anti -CD49b antibody and analyzed by flow cytometery. Statistically significant value compared with CT (*p<0.05).

IV. 考 察

류마티스관절염은 임상적인 증상으로 보아 한의학에서 痺證과 歷節風의 범주에 속한다. 이는 내인과 외인이 동시에 작용하는 것으로 肝腎虧損, 陽氣不足, 衛外不固한 虛證 상태에서 風寒濕邪氣가 經絡, 肌肉 및 關節에 침습하여 발생하는 것으로 정의되고 있다[17-20]. 이러한 병리적 상황이 지속되면 체내에 이차적 병리 물질인 痰飮과 瘀血이 凝聚不散되고, 이로 인한 악순환으로 氣血의 순환 장애가 심화되면서 난치성 질환으로 발전되게 된다.

이에 대한 치료법으로는 溫陽補腎, 補益氣血, 祛風除濕, 淸熱解毒, 活血散瘀, 搜風化痰 등의 치법 등이 사용되고, 침구 치료나 추나요법 등이 병용된다[17-20]. 최근 중국에서는 동서의학의 겸용 치료가 치료 효과를 제고함과 동시에 재발을 방지하고 치료 기간을 단축시킬 수 있음을 보고[19, 20]한 바가 있다.

본 시료인 利濕活通湯(ESWTT)은 淸熱利濕藥을 중심으로 活血化瘀 약물이 가미된 처방으로, 임상에서 관절염에 광범위하게 활용되고 있다. 특히 구성 약물중 김[24]은 "赤芍藥混合 藥鍼液이 關節炎 白鼠의 炎症과 肝에 미치는 影響"을, 이[25]는 "忍冬藤의 免疫調節作用에 대한 實驗的 연구"를, 김[26]은 "黃栢 藥鍼이 lipopolysaccharide 유발 관절염의 IL-1β 발현 억제에 미치는 영향"을, 오[27]는 "土茯苓이 inflammatory cytokines의 발현 및 생성에 미치는 영향"을, 이28)는 "牛膝 藥鍼이 LPS 유발 관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향"을 보고한 바가 있다. 아울러 임상에서는 본 시료와 유사한 구성으로 이루어진 抗關節炎 처방이 환자의 관절 증상 개선과 더불어 併發되는 다양한 증상에 유의적인 효과가 있음이 보고1[7-20]된 바가 있다.

류마티스 관절염의 발병 요인에 대한 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 현재는 자가면역질환으로 이해되고 있다[1-3, 30]. 류마티스 관절염 환자의 활액을 살펴보면 다양한 면역세포들을 확인할 수 있는데, 활액에는 B 세포나 T 세포와 같은 림프구뿐만 아니라 대식세포, 다핵형 세포들이 다수 관찰되며, TNF-α, IL-1β, IFN-γ와 같은 염증성 사이토카인의 발현이 증가되어 있는 것을 볼 수가 있다[31]. 또한 RANTES, MCP-1/2, MIP-1과 같은 케모카인들이 T 세포나 대식세포들에 의해 분비되면서, 다수의 면역세포들을 관절 부위로 이끄는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[32, 33]. 면역세포인 T 세포나 단핵구, 대식세포외에도 관절에 존재하는 섬유모세포(fibroblast)들도 사이토카인 및 케모카인을 분비하는 것으로 알려져 있는데, 이들 세포가 활액으

로 분비한 면역 매개물질들은 T 세포의 분화를 유도하여 관절 부위의 염증 반응을 이끌게 된다 34). 또한 이들 물질은 chondrocyte, synovial fibroblast, osteoclast와 같은 세포에 작용하여 matrix metaloprotease (MMP)의 발현을 증가시키는 역할을 한다[35, 36]. 실제로 류마티스 관절염 환자의 활액에는 MMP-1, MMP-3, MMP-13의 양이 증가되어 있는 것을 관찰 할 수 있는데, 이 효소들은 활막과 연골을 파괴하여 관절 조직을 붕괴시키는 인자로 인식되고 있다[37].

이처럼 류마티스 관절염이 면역 질환의 일종으로 이해되면서 면역계의 조절을 통한 치료 방법이 다양하게 시도되고 있다. 가장 대표적인 방법으로는 TNF-α나 IL-1β에 대한 항체를 사용하거나[38, 39] 이들의 수용성 수용체를 주입하여 염증성 사이토카인을 중화시킴으로써 염증 반응을 억제하여 치료 효과를 얻는 방법[40, 41] 과 cyclooxigenase-2 (Cox-2) 특이적 억제제를 사용하는 것이다. Cox-2는 MMP의 발현을 유도하여 cartilage를 붕괴시키는 역할을 하는 것으로 알려진 prosta- glandin을 생성하는 효소로써 류마티스 관절염 환자의 활액에서 그 발현이 증가되어 있다[42]. 따라서 Cox-2 특이억제제를 사용하여 prostaglandin의 생성을 줄임으로써 관절염에 의한 통증을 약화시키는 방식으로 질병을 치료하는 방법이 시도되고 있다. 그러나 Celecoxib와 같은 Cox-2 억제제는 위장관 질환 및 혈관 질병을 유발할 수 있으며 파괴된 관절을 복구하지 못하는 단점[13]을 가지고 있어 안전하면서도 효과적인 관절염 치료제의 개발이 더욱 요구되고 있다.

비장의 기능에 대해서는 아직까지 많은 것이 밝혀지지 않았으나 면역계와 밀접한 관련이 있는 신체기관으로 밝혀지고 있다. 비장이 제거된 환자의 경우 감염이 증가하는 연구 결과[43]는 이 신체 기관이 병원균에 대한 방어 작용에 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침해준다. 또한 이곳에서 노쇠한 적혈구들의 파괴가 이루어지며 림프구들의 저장 장소로 사용되고 있어, T 세포 및 B 세포들이 다수 존재하고 있다. 특히 비장의 기능이 파괴되는 질병인 Felty's syndrom 환자는 류마티스 관절염의 증상을 나타내고 있으며[44], 관절염 환자의 비장은 그 크기가 비대해져 있다는 보고45)가 있어 비장과 관절염은 서로 밀접한 관계가 있는 것으로 보여진다. 또한 일부 B 세포는 비장에서 분화하는데, 이러한 B 세포는 자가항체를 생산하여 자가면역질환을 유발하는 것으로 알려져 있다[46].

이에 본 실험에서는 ESWTT가 나타내는 관절염 억제 효과를 비장세포의 구성 및 비장세포가 분비하는 사이토카인을 분석하여 알아보았다. 우선 ESWTT을 투여한 생쥐의 비장에 존재하는 면역세포의 구성 변화를 관찰하였는데, 비장에 존재하는 총세포수에 있어 ESWTT을 400 mg/kg로 투여한 생쥐는 대조군에 비해 42%나 감소한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1).

다음으로 세포특이적인 항체를 사용하여 림프구들의 변화를 살펴보았는데, 먼저 CD19를 사용한 B 세포[47]의 변화에서는 대조군에서 118.4 ± 5.9 (106)이던 세포 수가 ESWTT을 투여한 경우 400 mg/kg와 200 mg/kg에서 각각 58.2 ± 2.3 (106), 64.3 ± 3.1 (106)으로 나타나 대조군에 비해 B 세포의 수가 50% 정도 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 류마티스 관절염 환자의 활액에서는 IgM 또는 IgG의 양이 증가되어 있는 것으로 알려져 있는데, 이들 항체는 B 세포가 분비하게 되며 자가항체로 작용하여 rheumatoid factor가 된다[48]. 또한 B 세포는 관절염 부위에서 T 세포의 활성을 유도하는 중요한 세포라는 연구 결과[49]도 있어 비록 단편적이지만 CD19를 사용한 B 세포의 변화는 본 시료가 자가항체의 생성을 억제하고 T 세포의 활성을 억제할 수 있음을 시사해주고 있다.

비장에 존재하는 CD3+ 인 T 세포[50]들의 수는 비록 200 mg/kg에서 유의적이지 않았지만, 400 mg/kg로 약물을 처리하였을 경우 대조군에 비해 26% 정도의 세포감소 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 활성화된 T 세포를 알아보기 위하여 CD3+/CD69+로 이중표지[51]를 시킨 뒤 두 가지 표지에 모두 양성 반응을 나타낸 세포의 수를 확

인한 결과, 200 mg/kg, 400 mg/kg의 ESWTT 투여군에서 대조군에 비해 각각 75%, 80% 정도의 감소 효과가 나타났다 (Fig. 4).

T 세포를 구성하는 대표적인 세포 중 하나인 CD4+ helper T cell은 류마티스성 관절염 환자의 활액에서 그 수가 증가되어 있으며, IFN-γ와 같은 염증성 사이토카인을 분비하는 세포로 알려져 있는데[52]. 본 실험에서는 감소하는 경향을 나타내었지만 유의적이지는 않았다 (Fig. 5). CD8+ cytotoxic T 세포의 경우도 그 수가 감소하였지만 유의적이지 않았다 (Fig. 7). 반면 대조군에서 크게 증가하였던 CD4+CD25+ T 세포는 ESWTT을 투여하였을 경우 그 수가 크게 감소하였다 (Fig. 6). 이들 세포는 regulatory T 세포로써 보통 regulatory T 세포는 자가면역을 억제하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있으나[53, 54], 자가면역 질환을 앓고 있는 관절염 환자의 혈액에는 오히려 이들 세포의 수가 증가되어 있다고 보고되어 있다[55, 56]. 이러한 이유는 관절염 환자에게서 자가면역 반응을 억제하기 위한 자기방어 기능이 작동했기 때문이며, 관절염이 계속 유발되면 regulatory T 세포들의 수가 지속적으로 증식되어 있는 만성적인 상태로 빠지게 되기 때문으로 해석되고 있다[57]. 본 연구에서도 대조군에서 regulatory T 세포의 수가 정상적인 상태에 비해 크게 증가되어 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6). 이러한 현상은 콜라젠으로 유도된 관절염 반응이 만성적인 상태로 바뀌었기 때문으로 여겨진다. 반면 ESWTT을 투여한 생쥐는 CD4+CD25+ 세포의 수가 감소한 것을 볼 수 있는데, 이 같은 결과는 본 시료에 의해 만성적으로 증가되어 있던 자가 면역 반응이 감소되었음을 간접적으로 보여주고 있으며, 본 시료가 T 세포들의 수를 억제함으로써 관절염에 효과가 있음을 시사하고 있다.

V. 結 論

현재 임상에서 류마티스관절염에 활용되고 있는 利濕活通湯(ESWTT)의 면역학적 효능을 객관적으로 규명하고자 관절염 병태 동물 모델에서 비장에 존재하는 면역세포의 변화를 살펴 보았던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 비장의 총 세포수를 400 mg/kg과 200 mg/kg에서 각각 41%와 32% 정도 유의성 있게 감소시켰다.

2. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 비장에 존재하는 CD19+ 세포의 수를 400 mg/kg과 200 mg/kg에서 각각 51%, 46% 정도 유의성 있게 감소시켰다.

3. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 400 mg/kg에서 비장에 존재하는 CD3+의 수를 26% 정도 유의성 있게 감소시켰다.

4. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 비장에 존재하는 CD3+/CD69+ 세포의 수를 400 mg/kg와 200 mg/kg에서 각각 79%와 76%씩 감소시켰다.

5. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 비장에 존재하는 CD4+ 세포와 CD8+ 세포의 수를 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

6. 利濕活通湯은 대조군에 비하여 비장에 존재하는 CD4+/CD25+ 세포의 수를 400 mg/kg와 200 mg/kg에서 각각 60%, 56%씩 감소시켰다.

이상의 결과를 종합하면 利濕活通湯은 B 세포 및 T 세포와 같은 림프구들의 증식을 억제함으로써 면역조절 작용을 통한 항류마티스 효과가 인정된다.

參 考 文 獻

1. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, Rheumatoid arthritis. Cell, 85(3): 307-10, 1996.
2. Ospelt, C., et al., Synovial activation in rheumatoid arthritis.Front Biosci, 9: 2323-34, 2004.
3. Mor, A., S.B. Abramson, and M.H. Pillinger, The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis : a key player in inflammation and joint destruction. Clin Immunol, 115(2): 118-28, 2005.
4. Koch, A.E., et al., Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. J Immunol, 147(7): 2187-95, 1991.
5. Weyand, C.M. and J.J. Goronzy, Pathogenesis of rheumatoid arthritis. Med Clin North Am, 81(1): 29-55, 1997.
6. Weyand, C.M., T.M. Seyler, and J.J. Goronzy, B cells in rheumatoid synovitis. Arthritis Res Ther, 7 Suppl 3: S9-12, 2005.
7. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, T-cell regulation in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol, 16(3): 212-7, 2004.
8. Simon, A.K., E. Seipelt, and J. Sieper, Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(18): 8562-6, 1994.
9. Stastny, P., Rheumatoid arthritis: relationship with HLA-D.Am J Med, 75(6A): 9-15, 1983.
10. Kalden, J.R. and B. Manger, Biologic agents in the treatment of inflammatory rheumatic diseases. Curr Opin Rheumatol, 9(3): 206-12, 1997.
11. Isles, C., et al., Risk of major gastrointestinal bleeding with aspirin. Lancet, 353(9147): 148-50, 1999.
12. Hawkey, C.J., COX-2 inhibitors.Lancet, 353(9149): 307-14, 1999.
13. Feldmann, M., Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol, 2(5): 364-71, 2002.
14. Bresnihan, B., Treatment of rheumatoid arthritis with interleukin 1 receptor antagonist. Ann Rheum Dis, 58 Suppl 1: I96-8, 1999.
15. Silverstein, F.E., et al., Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis : the CLASS study : A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. Jama, 284(10): 1247-55, 2000.
16. Chan, A.L., Celecoxib-induced deep-vein thrombosis. Ann Pharmacother, 39(6): 1138, 2005.
17. 오승옥 외 편저 : 類風濕關節炎的中醫特色治療, 上海中醫藥大學出版社, pp. 23-34, p.45, p.53, p.57, p.61, 2004.
18. 하청호 외 : 名家醫案, 妙方解析 風濕病, 人民軍醫出版社, pp.199-203, 2007.
19. 도효화 : 風濕病, 人民衛生出版社, pp.260-275, 2004.
20. 곽설신 외 : 風濕病效方400首, 科學技術文獻出版社, pp.20-59, 2005.
21. 이검송 외 : 風濕病秘方全書, 科學技術文獻出版社, pp.1-35, 2005.
22. 최도영 외 : 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향, 大韓鍼灸學會誌, 21(4): 177-196, 2004.
23. 서해경 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.
24. 김병수 외 : 玄胡索·赤芍藥·紅花 混合藥鍼

掖이 關節炎 白鼠의 炎症과 肝에 미치는 影響, 大韓本草學會誌, 19(1):95-102, 2004.
25. 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.
26. 김철호 외 : 황백(黃栢)및 위영선약침(威靈仙藥鍼)이 Lipopolysaccharide 유발관절염의 IL-1β 발현 억제에 미치는 영향, 大韓鍼灸學會誌, 16(1):511-531, 1999.
27. 오승규 외 : 토복령이 IL-1β 와 TNF-α로 유발된 Inflammatory Cytokines의 발현 및 생성에 미치는 영향, 大韓本草學會誌, 18(1): 49-64, 2003.
28. 이승덕 외 : 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향, 大韓鍼灸學會誌, 16(3): 287-315, 1999.
29. 김영훈, 류마티스양 관절염에 응용되는 방기의(防己) 효능에 관한 실험적 연구, 東西醫學, 12(4): 35-57, 1987.
30. Doan, T. and E. Massarotti, Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. J Clin Pharmacol, 45(7):751-62, 2005.
31. Steiner, G., et al., Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), 38(3): 202-13, 1999.
32. Volin, M.V., et al., RANTES expression and contribution to monocyte chemotaxis in arthritis. Clin Immunol Immunopathol, 89(1):44-53, 1998.
33. Villiger, P.M., R. Terkeltaub, and M. Lotz, Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. J Immunol, 149(2): 722-7, 1992.
34. Schnare, M., et al., Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol, 2(10): 947-50, 2001.
35. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, The potential of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: Is it all just JNK? J Clin Invest, 108(2): 181-3, 2001.
36. Borden, P., et al., Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. J Biol Chem, 271(38): 23577-81, 1996.
37. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., Matrix metalloproteinases.J Biol Chem, 274(31): 21491-4, 1999.
38. Lorenz, H.M., et al., In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. J Immunol, 156(4): 1646-53, 1996.
39. Marinova-Mutafchieva, L., et al., Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). Clin Exp Immunol, 107(3): 507-12, 1997.
40. Moreland, L.W., et al., Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. N Engl J Med, 337(3):141-7, 1997.
41. Makarov, S.S., et al., Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(1): 402-6, 1996.
42. Siegle, I., et al., Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential

elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. Arthritis Rheum, 41(1):122-9, 1998.
43. Horan, M. and J.H. Colebatch, Relation between splenectomy and subsequent infection. A clinical study. Arch Dis Child, 37: 398-414, 1962.
44. Haskard, D.O., et al., Spontaneous rupture of the spleen in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 42(4):411-4, 1983.
45. Nishiya, K., et al., Enlarged spleen detected by abdominal ultrasonography in patients with RA. Ann Rheum Dis, 59(9):751-2, 2000.
46. Nishizumi, H., et al., Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. Immunity, 3(5): 549-60, 1995.
47. Zhou, L.J., et al., Structure of the genes encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. Immunogenetics, 35(2):102-11, 1992.
48. Carson, D.A., P.P. Chen, and T.J. Kipps, New roles for rheumatoid factor. J Clin Invest, 87(2):379-83, 1991.
49. Takemura, S., et al., T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. J Immunol, 167(8):4710-8, 2001.
50. Clevers, H., et al., Characterization and expression of the murine CD3-epsilon gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 85(22):8623-7, 1988.
51. Bieber, T., et al., CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. J Invest Dermatol, 98(5):771-6, 1992.
52. Berner, B., et al., Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. J Rheumatol, 27(5): 1128-35, 2000.
53. Sakaguchi, S., et al., Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev, 182:18-32, 2001.
54. Taams, L.S., et al., Antigen-specific T cell suppression by human CD4+ CD25+ regulatory T cells. Eur J Immunol, 32(6):1621-30, 2002.
55. Minami, R., et al., [The role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with Rheumatoid Arthritis]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 29(1): 37-42, 2006.
56. Morgan, M.E., et al., CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum, 48(5): 1452-60, 2003.
57. van Amelsfort, J.M., et al., CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. Arthritis Rheum, 50(9): 2775-85, 2004.