대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.22 NO.2 : 001-025 (2009)

全生活血湯加味方의 면역조절 작용을 통한 항관절염 효능에 관한 연구

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
고정민, 최창민, 조한백, 김송백

ABSTRACT

Anti-arthritis Effects of *Jeonsaenghwalhyeoltanggamibang* through Immune Modulation

Jeong-Min Ko, Chang-Min Choe, Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: The purpose of this study is to investigate the anti-arthritis effects of *Jeonsaenghwalhyeoltanggamibang*(JHTG) on collagen-induced arthritis(CIA) in mice.

Methods: To assess the effects of JHTG on CIA in mice, we conducted several experiments such as analysis of arthritis index, cell count of draining lymph node(DLN) and paw joint, measurement of serum antibody levels and observation of the histological changes of joint.

Results:
1. JHTG extract had a suppressive effect on the arthritis index of paw joints in CIA mice.
2. JHTG extract increased the total cell number of DLN, and decreased the total cell number of paw joints in CIA mice.
3. JHTG extract increased the absolute number of various cell surface receptors in DLN, and decreased the absolute number of B220+/CD23+ cells in DLN in CIA mice.
4. JHTG extract decreased the absolute number of CD3+, CD4+, CD11b+/Gr-1 cells in paw joint in CIA mice.
5. JHTG extract didn't decrease the absolute number of CD4+/CD25+ cells in paw joints in CIA mice.
6. JHTG extract decreased levels of total IgM in the serum of CIA mice, but had no effect on levels of collagen Ⅱ specific antibody.
7. JHTG extract decreased the destruction of articular cartilages and collagen fibers and the proliferation of synovial cells in paw joints from CIA mice.

Conclusion: These results indicate that JHTG has clinical potential for the treatment of rheumatoid arthritis by modulating the immune response.

Key Words: *Jeonsaenghwalhyeoltanggamibang*(JHTG), Rheumatoid Arthritis (RA), CIA, lymphocyte, herbal medicine

"이 논문은 2008년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구됨."
"This research was supported by Wonkwang Univ. Research Fund. 2008"

교신저자(김송백) : 전북 전주시 덕진구 덕진2가 142-1번지 원광대 전주한방병원 부인과
전화 : 063-270-1018 이메일 : ksb9714@lycos.co.kr

Ⅰ. 緖 論

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis ; RA)은 대표적인 자가 면역 질환으로 관절내 활막염으로 시작되고, 점차 진행하여 결국 관절의 파괴와 변형을 초래하는 만성 염증성 질환으로[1,2], 최근 연구에 의하면 전 세계적으로 다양한 유병율을 보이고 있지만, 전인구의 유병률은 약 0.8%정도로 추정된다[2-5].

류마티스 관절염의 위험인자로 여러 가지 요인이 제시되고 있지만, 여성이 남성보다 2~4배 정도 많으며[5], 출산 후에는 다른 시기에 비하여 5배 정도 발생률이 증가되고[6-10], 전체 여성환자에서 임신과 분만후 12.3%가 발생하며[11] 임신이 위험인자로 제시되고 있는 점은[11,12] 산후의 관절통증이 류마티스 관절염과 밀접한 관련이 있음을 말해 주고 있다.

한의학에서는 류마티스 관절염을 痺症, 痛痺, 歷節風, 白虎風, 鶴膝風, 風痺, 類風濕性關節炎이라 표현하고 있으며, 임상적으로 筋骨, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 酸脹, 重着, 麻木 및 關節의 屈伸不利 등의 증상을 수반하는 질환으로, 단순한 관절의 염증이라기보다는 전신질환으로 보고 있다[13,14]. 原因으로는 평소의 氣血不足, 營衛不固, 肝腎不足등 虛證을 기반으로 風寒濕 三氣가 침입하여 발생하는 것으로 인식되고 있고[13], 産褥期 여성의 병태생리적인 특징이 氣血虛弱이며, 産後 疾患은 氣血虛弱 상태에서 風寒濕瘀 등의 邪氣가 인체에 침습하여 발생한다는 점[15]에서 발병기전의 유사성을 찾을 수 있다.

全生活血湯은 李[16]의 《蘭室秘藏・婦人門》에 "婦人分娩 及半産漏下 …… 今立一方 補血 養血 生血 益陽 以補手足厥陰之不足也."라 하여 最初로 收載된 이래 血虛로 인한 産後風 증상에 사용된 處方으로[16-18], 본 연구에는 全生活血湯에서 藁本을 제외하고 舒筋活絡止痛의 효능이 있는 豨薟, 鷄血藤, 玄胡索을 가미하여 산후에 발생한 관절통증의 치료에 사용하는 임상처방인 全生活血湯加味方이 사용되었다.

최근 한약을 이용한 관절 염증의 치료에 관한 많은 연구[19-27]가 이루어지고 있으나, 全生活血湯 및 全生活血湯加味方에 관한 실험적 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 全生活血湯加味方의 면역기전 조절을 통한 항관절염 효능을 알아보기 위하여, DBA/1J 생쥐에 collagen 유발 관절염을 유도시켜 관절염 유발율에 미치는 영향을 검사하고, draining lymph node(DLN)과 paw joint의 면역세포수, rheumatoid factor 분석, 혈청 내 collagen Ⅱ 항체 농도 측정 및 병리조직 검사를 실시하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 폴라스인터내셔날 (England)에서 분양받은 6주령, 체중 20~22 g의 DBA/1J 생쥐를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0 ± 2℃, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛

을 차단하였다. 식이는 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, 항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약 재

본 실험에 사용한 全生活血湯加味方(JHTG)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of *Jeonsaenghwalhyeoltanggamibang*(JHTG)

韓藥名	生 藥 名	(g)
白芍藥	RADIX PAEONIAE ALBA	4
防 風	RADIX SAPOSHNIKOVIAE	3
羌 活	RHIZOMA SEU RADIX NOTOPTERYGII	3
升 麻	RHIZOMA CIMICIFUGAE	4
獨 活	RADIX ARALIA CORDATAE	3
柴 胡	RADIX BUPLEURI	3
當 歸	RADIX ANGELICAE SINENS	3
葛 根	RADIX PUERARIAE	3
川 芎	RHIZOMA CHUANXIONG	2
生地黃	RADIX REHMANNIAE RECENS	5
熟地黃	RADIX REHMANNIAE PREPARATA	5
甘 草	RADIX GLYCYRRHIZAE	3
蔓荊子	FRUCTUS VITICIS	1.2
鷄血藤	CAULIS SPATHOLOBI	6
細 辛	HERBA ASARI	1.2
紅 花	FLOS CARTHAMI	1.2
玄胡索	RHIZOMA CORYDALIS	1.2
豨 薟	HERBA SIEGESBECKIAE	8
	Total amount	59.8

3) 시약 및 기기

Bovine typeII collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH_4Cl, $KHCO_3$, trypan blue, ethyl ether, collagenase, diethyl pyrocarbonate (DEPC), tris base, RPMI1640, trypsin-0.2% EDTA, 2,7-dichloro-dihydrofluorescindiacettate (DCFH-DA), chloroform, trichloroacetic acid (TCA), isopropanol, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 등은 Sigma사 (U.S.A.) 제품을, IgG, IgM, CII 항체 kit는 Scientific Pierce사 (U.S.A.) 제품을, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A.) 제품을, DMEM은 Gibco사 (U.S.A.) 제품을, PE-anti-CD3, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-B220, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, FITC-anti-CD23, FITC-anti-MHCⅡ, FITC-anti-CD44는 BD-Pharm-ingen사 (U.S.A.) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기로 열탕추출기는 대웅사 (Korea), microwave oven은 LG사 (Korea), flow cytometer는 Becton Dickinson사 (U.S.A.), spectrophotometer는 Shimazue사 (Japan), centrifuge는 한일사 (Korea), deep freezer는 Sanyo사 (Japan), heating block, ice-maker는 Vision scientific사 (Korea), CO_2 incubator는 Forma scientific사 (U.S.A.), clean bench는 Vision scientific사 (Korea), rotary vacuum evaporator는 Büchi사 (Switzerland), freeze dryer는 EYELA사 (Japan), autoclave는 Sanyo사 (Japan), imager system은 Kodak사 (U.S.A), plate shaker는 Lab-line사 (U.S.A.), ELISA

Reader는 Molecular devices사 (U.S.A), homogenizer는 OMNI사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

全生活血湯加味方 2첩 분량에 증류수 1,500 ㎖를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 동안 가열하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였고 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 후 (24.5 g), 냉동 (-80℃) 보관하면서 실험시에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 human fibroblast Cells (hFCs)을 이용하여 SRB assay법[28]을 사용하였다. hFCs는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 자란 것을 trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 x 10^4개 세포로 96 well plate에 분주한 다음 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 全生活血湯加味方 (최종 농도 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ㎍/㎖)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA를 50 ㎕씩 가하여 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액 (1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 ㎕를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base (100 ㎕)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 초당 3.5회의 속도로 5분간 흔들어 준 후 ELISA Reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 혈청 AST, ALT 측정

실험 종료 후 심장 채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 검사기관인 biotoxtech (주) (청원, 충북)에 의뢰하여 AST, ALT를 측정하였다.

3) Collagen 유발 관절염(CIA) 생쥐 모델

Collagen 유발 관절염(CIA)은 bovine typeII collagen에 0.01 ㎮/ℓ의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 ㎕를 DBA/1J 생쥐에 피하주사하고, 21일 후 동량을 피하주사로 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험은 DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate (MTX)를 투여한 양성대조군 (이하 MTX 투여군) 및 全生活血湯加味方을 투여한 실험군(이하 실험군)으로 나누어 실험을 실시하였다.

4) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 8마리를 한 군으로 하여 정상군, 대조군, MTX (0.3 ㎎/㎏) 투여군, 실험군 (10.2 ㎎/day)으로 나누어 booster 한 후, 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 ㎎/㎏)를 매일 1회 각각 0.1 ㎖씩 복강에 주사하였으며, 실험군은 全生活血湯加味方 (10.2 ㎎/day)을 4주 동안 매일 오전 11시에 경구 투여하

였다.

5) Arthritis Index (AI) 분석

TypeII collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율 (Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도(Table 2)를 1주일에 1회씩 검사하였다.

Table 2. Arthritis score

단 계	유발정도
0	No arthritis
1	Small degree of arthritis
2	Light swelling
3	Medium swelling
4	Severe swelling

6) Draining lymph node (DLN), paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 DLN 및 paw joint를 적출하였다. 100mesh로 분리한 DLN 세포에 D-PBS를 가한 후 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 로 2회 세척한 후 cell strainer (Falcon)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 ㎎/㎖ (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고, 37℃ shaker (180 rpm, 20 mins.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (absolute number)를 산출하였다.

7) 형광 유세포 분석

총세포수 측정과 동일한 방법으로 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-B220, FITC-anti-MHCⅡ를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 세척한 후 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 DLN, paw joint에서의 절대세포수(absolute number)를 산출하였다.

8) Rheumatoid Factor (RF) 분석

4주간 index 값을 측정한 후 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IgG와 IgM을 kit로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척하였다. 여기에 HRP-conjugeted Avidin 100 ㎕를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 재세척하였다. 다시 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 暗所에서 30분간 방치한 후 50 ㎕의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader로 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II(CII) 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후 collagen II kit로 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/200 dilution)씩 분주하고, 12시간 동안 4℃ 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin-conjugated

를 넣고 30분간 방치하였다. 이를 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugeteda Avidin 100 ㎕를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고, 暗所에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

10) 병리 조직 검사

약물 투여 4주일 후에 정상군, 대조군, MTX 투여군, 실험군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세하였다. 이를 epoxy에 포매한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin 염색과 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

11) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error (S.E.)로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 實驗成績

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성 실험에서는 대조군의 세포생존율이 100±5.8 (%)로 나타난 반면, 全生活血湯加味方 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250, 500 (㎍/㎖) 농도로 투여한 군에서는 각각 101.4±2.6, 99.7±3.2, 96.5±2.1, 92.0±2.6 및 87.6±3.5 (%)로 나타났다(Fig. 1).

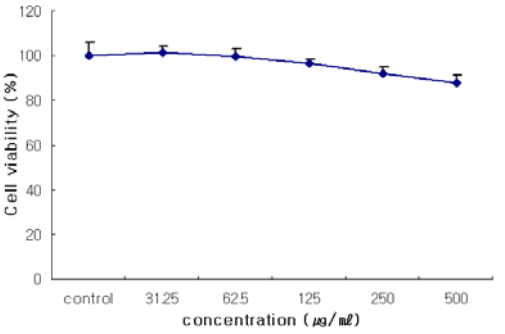

Fig. 1. Cytotoxicity of JHTG on human fibroblast Cells (hFCs).
Human fibroblast cells (hFCs) were treated with various concentration (31.25, 62.5, 125, 250, 500 ㎍/㎖) of JHTG extract.

2. AST, ALT에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 AST는, 정상군, 대조군, MTX 투여군, 실험군에서 각각 101.1 ± 2.1 (U/L), 92.0 ± 10.7 (U/L), 109.4 ± 4.6 (U/L), 83.9 ± 8.5 (U/L)로 큰 차이를 나타내지 않았다. ALT는 정상군이 37.3 ± 2.4 (U/L), 대조군이 30.3 ± 1.6 (U/L), 양성대조군인 MTX 투여군에서는 155.7 ± 10.4 (U/L), 실험군에서는 26.0 ± 2.2 (U/L)로 나타나 MTX 투여군에서 상승을 보였다(Fig. 2).

3. 관절염 유발율에 미치는 영향

全生活血湯加味方이 관절염 유발율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여 1주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군의 관절염 지수가 감소함을 보였으나 유의성은 없었고, 2주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군만 유의한 감소를 보였으며 (*$p<0.05$), 3주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군에서는 유의한 감소를 보였으나 (**$p<0.01$), 실험군에서는 감소를 보였지만 유의성은 없었으며, 4

주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군 모두 유의성 있는 (*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

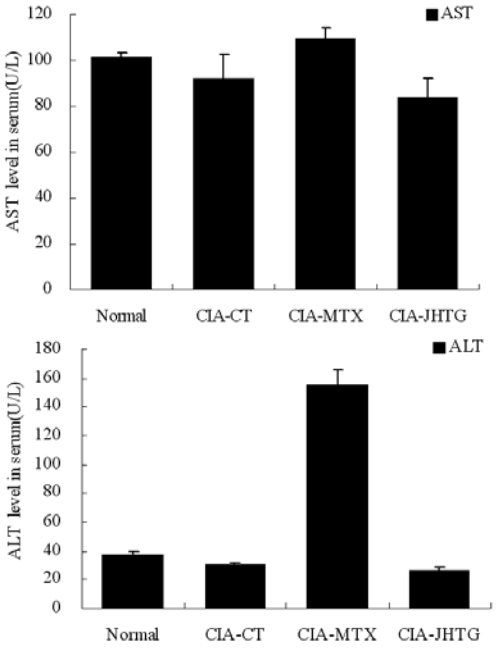

Fig. 2. Effects of JHTG on the ALT and AST in CIA mice.
Normal : Normal DBA/1J mouse group. CT : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection. MTX : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and MTX (0.3 ㎎/㎏) I.P injection. JHTG : DBA/1J mouse group with collagen S.C injection and JHTG (10.2 ㎎/day/0.2㎖) oral treated.

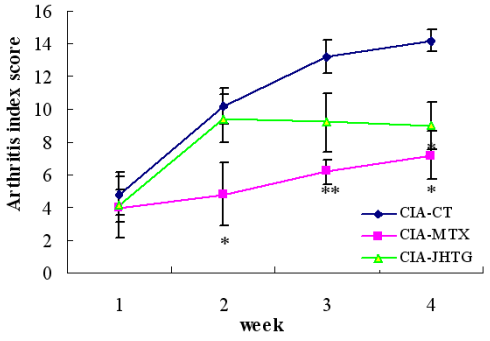

Fig. 3. Suppressive effect of JHTG on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into three groups. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (*p<0.05, **p<0.01).

4. DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 4주간 全生活血湯加味方을 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군이 6.5 ± 1.60 ($x10^6$), 대조군이 1.57 ± 0.24 ($x10^6$), MTX 투여군이 4.96 ± 1.26 ($x10^6$), 실험군이 6.45 ± 2.25 ($x10^6$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군은 유의성 있는 감소를 나타내었으며(+++p<0.001), 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군에서 유의성 (*p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 4).

Paw joint에서는 정상군이 5.1 ± 0.9 ($x10^6$), 대조군이 24.3 ± 2.7($x10^6$), MTX 투여군이 12.9 ± 0.3 ($x10^6$), 실험군이 18.0 ± 0.6 ($x10^6$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군은 유의성 있는 증가를 나타내었으며(+++p<0.001), 대조군에 비하여 MTX 투여군 (**p<0.01)과 실험군 (*p<0.05)에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

5. 면역세포에 미치는 영향

1) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19+ 세포 발현

DLN에서 CD19+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 19.1 ± 6.5 ($x10^4$), 대조군이 6.4 ± 1.1 ($x10^4$), MTX 투여군이 14.1 ± 3.5 ($x10^4$), 실험군이 23.1 ± 4.3 ($x10^4$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군은 유의한 감소를 보였고 (+p<0.05), 대조군에 비하여 MTX 투여

군 (*p<0.05) 과 실험군 (**p<0.01) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 5).

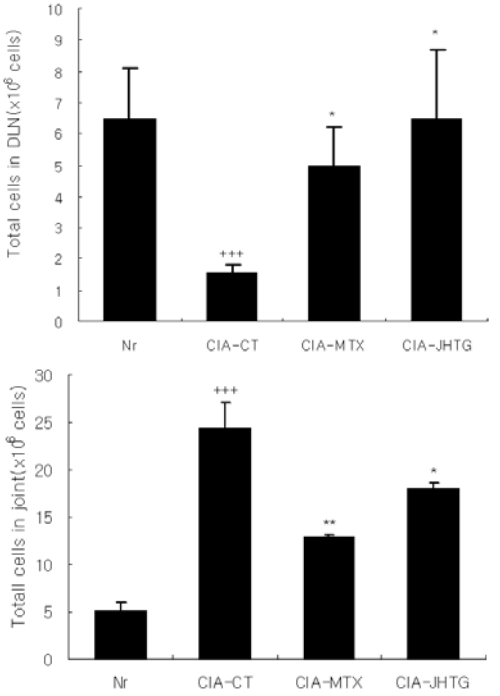

Fig. 4. Effect of JHTG on total cell number of DLN and paw joint in CIA mice.
Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control by T test (*p<0.05, **p<0.01).

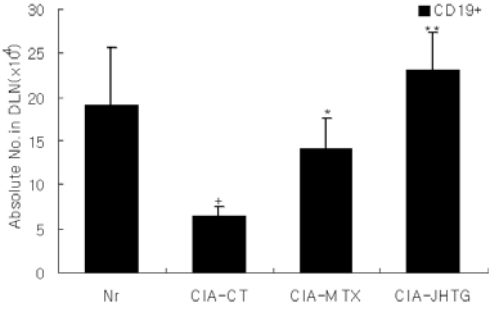

Fig. 5. Effects of JHTG on absolute number of CD19+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD19+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+p<0.05). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, **p<0.01).

(2) CD3+ 세포 발현

DLN에서 CD3+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 43.8 ± 7.8 ($x10^4$), 대조군이 7.7 ± 1.4 ($x10^4$), MTX 투여군이 30.6 ± 5.6 ($x10^4$), 실험군이 30.1 ± 6.0 ($x10^4$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 (+p<0.05) 있는 감소를 나타내었으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군 모두 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 6).

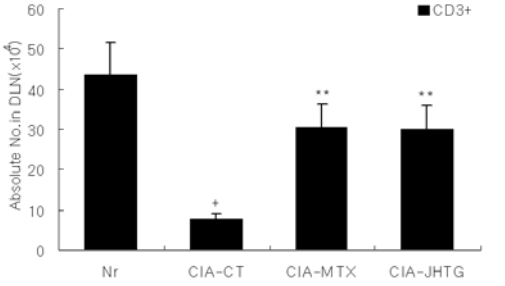

Fig. 6. Effects of JHTG on absolute number of CD3+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD3+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+p<0.05). Statistically significant value compared with CT by T test (**p<0.01).

(3) CD4+ 세포 발현

DLN에서 CD4+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 31.7 ± 7.3 ($x10^4$), 대조군이 4.5 ± 0.4 ($x10^4$), MTX 투여군이 20.9 ± 6.0 ($x10^4$), 실험군이 23.0 ± 8.7 ($x10^4$)로 나타나, 정상군에 비

하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (*p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 7).

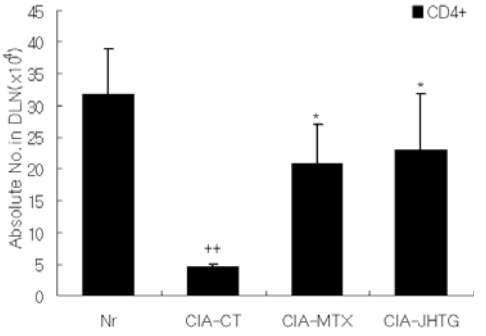

Fig. 7. Effects of JHTG on absolute number of CD4+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD4+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05).

(4) CD3+/CD69+ 세포 발현

DLN에서 CD3+/CD69+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 3.9 ± 1.4 (x10^4), 대조군이 1.6 ± 0.1 (x10^4), MTX 투여군이 5.1 ± 1.1 (x10^4), 실험군이 4.0 ± 1.3 (x10^4)로 나타나, 대조군에 비하여 MTX 투여군만 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 8).

(5) CD8+ 세포 발현

DLN에서 CD8+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 10.9 ± 2.3 (x10^4), 대조군이 2.1 ± 0.8 (x10^4), MTX 투여군이 8.3 ± 1.4 (x10^4), 실험군이 7.5 ± 1.6 (x10^4)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (**p<0.01), 실험군 (*p<0.05) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 9).

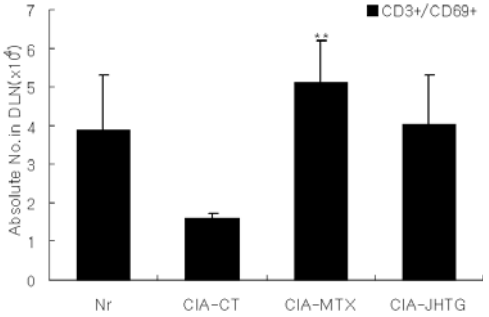

Fig. 8. Effects of JHTG on absolute number of CD3+/CD69+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD3+/CD69+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with CT by T test (**p<0.01).

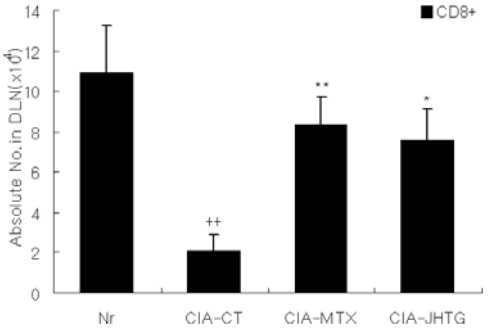

Fig. 9. Effects of JHTG on absolute number of CD8+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD8+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, **p<0.01).

(6) CD4+/CD25+ 세포 발현

DLN에서 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 5.9 ±

1.5 (x10^4), 대조군이 1.2 ± 0.1 (x10^4), MTX 투여군이 3.5 ± 1.1 (x10^4), 실험군이 4.7 ± 1.0 (x10^4)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (*p<0.05), 실험군 (**p<0.01) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 10).

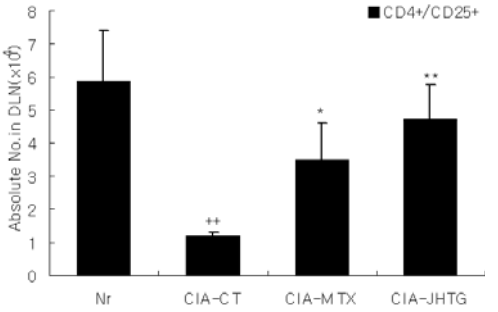

Fig. 10. Effects of JHTG on absolute number of CD4+/CD25+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD4+/CD25+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, **p<0.01).

(7) CD3+/CD49b+ 세포 발현

DLN에서 CD3+/CD49b+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 2.1 ± 0.5 (x10^4), 대조군이 0.5 ± 0.0 (x10^4), MTX 투여군이 3.8 ± 0.1(x10^4), 실험군이 1.7 ± 0.6 (x10^4)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (***p<0.001), 실험군 (*p<0.05) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 11).

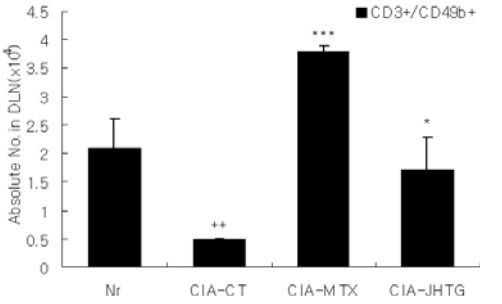

Fig. 11. Effects of JHTG on absolute number of CD3+/CD49b+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD3+/CD49b+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

(8) CD4+/CD44+ 세포 발현

DLN에서 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 18.3 ± 4.7 (x10^4), 대조군이 2.7 ± 0.2 (x10^4), MTX 투여군이 13.0 ± 2.6 (x10^4), 실험군이 13.5 ± 2.7 (x10^4)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 12).

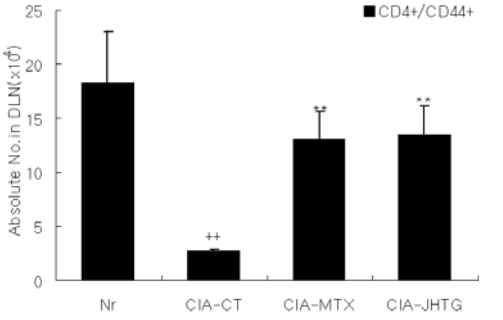

Fig. 12. Effects of JHTG on absolute number of CD4+/CD44+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks

administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD4+/CD44+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (**p<0.01).

(9) CD11c+/MHCⅡ+ 세포 발현

DLN에서 CD11c+/MHCⅡ+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD11c+/MHCⅡ+ 세포수를 절대 세포수로 산출한 결과, 정상군이 1.46 ± 0.1 ($x10^4$), 대조군이 2.8 ± 0.7 ($x10^4$), MTX 투여군이 1.7 ± 0.7 ($x10^4$), 실험군이 1.3 ± 0.3($x10^4$)로 나타나, 각 군간에 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 13).

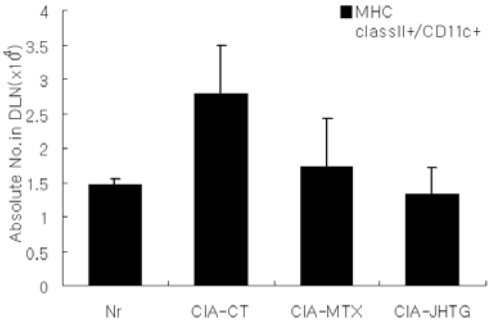

Fig. 13. Effects of JHTG on absolute number of CD11c+/MHCⅡ+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD11c+/MHCⅡ+ antibody and analyzed by flow cytometer.

(10) B220+/CD23+ 세포 발현

DLN에서 B220+/CD23+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 8.0 ± 0.1 ($x10^4$), 대조군이 17.7 ± 1.6 ($x10^4$), MTX 투여군이 12.9 ± 0.8 ($x10^4$), 실험군이 12.0± 0.7 ($x10^4$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 14).

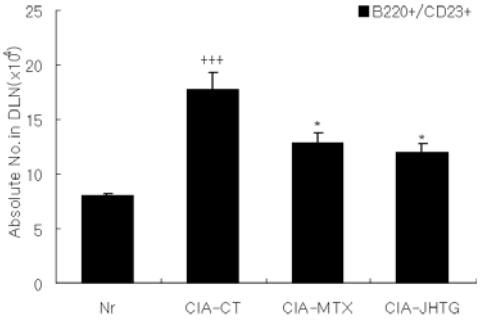

Fig. 14. Effects of JHTG on absolute number of B220+/CD23+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-B220+/CD23+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test(*p<0.05).

(11) CD3+/CD8+ 세포 발현

DLN에서 CD3+/CD8+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 10.1 ± 1.6 ($x10^4$), 대조군이 1.7 ± 0.3 ($x10^4$), MTX 투여군이 7.7 ± 0.6 ($x10^4$), 실험군이 6.4 ± 2.0 ($x10^4$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (***p<0.001), 실험군 (*p<0.05)에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 15).

2) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3+ 세포 발현

Paw joint에서 CD3+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 1.0 ± 0.3 ($x10^5$), 대조군이 31.1 ± 2.0 ($x10^5$), MTX 투여군이 4.6 ± 0.5 ($x10^5$), 실험군이 4.7 ± 1.2 ($x10^5$)로 나타나, 정상군에 비하여

대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 16).

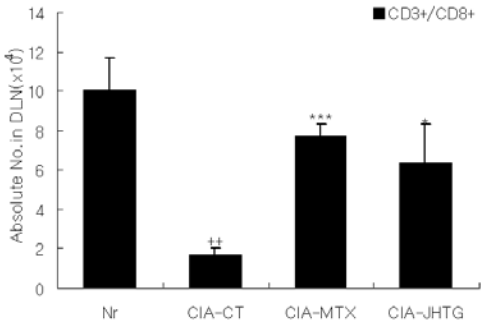

Fig. 15. Effects of JHTG on absolute number of CD3+/CD8+ cells in DLN of CIA mice.
Lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of JHTG. The cells were incubated with anti-CD3+/CD8+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

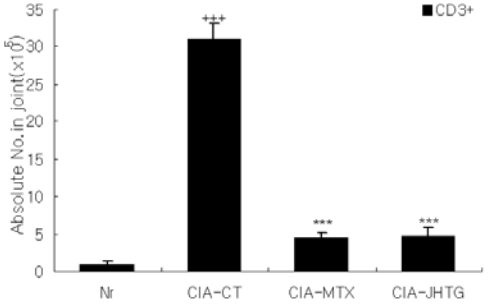

Fig. 16. Effects of JHTG on absolute number of CD3+ cells in paw joint of CIA mice.
Paw joint cells ($x10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4 weeks administration of JHTG. Cells were incubated with anti-CD3+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test (***p<0.001).

(2) CD4+ 세포 발현

Paw joint에서 CD4+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 0.3 ± 0.1 ($x10^5$), 대조군이 19.5 ± 0.5 ($x10^5$), MTX 투여군이 2.1 ± 0.2 ($x10^5$), 실험군이 3.0 ± 0.4 ($x10^5$)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 17).

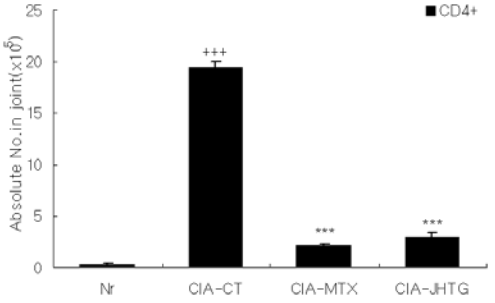

Fig. 17. Effects of JHTG on absolute number of CD4+ cells in paw joint of CIA mice.
Paw joint cells ($x10^5$ cells/ml) from paw joint were isolated following 4 weeks administration of JHTG. Cells were incubated with anti-CD4+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test(***p<0.001).

(3) CD4+/CD25+ 세포 발현

Paw joint에서 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 0.74 ± 0.2 ($x10^5$), 대조군이 2.41 ± 0.1 ($x10^5$), MTX 투여군이 2.34 ± 0.2 ($x10^5$), 실험군이 2.9 ± 0.3 ($x10^5$)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈다. 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군 모두 유의한 차이는 없었다(Fig. 18).

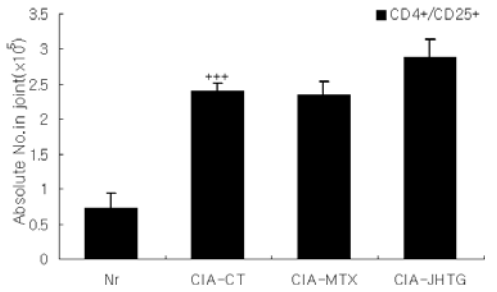

Fig. 18. Effects of JHTG on absolute number of CD4+/CD25+ cells in paw joint of CIA mice.
Paw joint cells (x10^5 cells/ml) from paw joint were isolated following 4 weeks administration of JHTG. Cells were incubated with anti-CD4+/CD25+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001).

(4) CD11b+/Gr-1+ 세포 발현

Paw joint에서 CD11b+/Gr-1+ 세포 수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 1.6 ± 0.2 (x10^5), 대조군이 126.4 ± 1.6 (x10^5), MTX 투여군이 47.8 ± 3.5 (x10^5), 실험군이 76.3 ± 2.7 (x10^5)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 19).

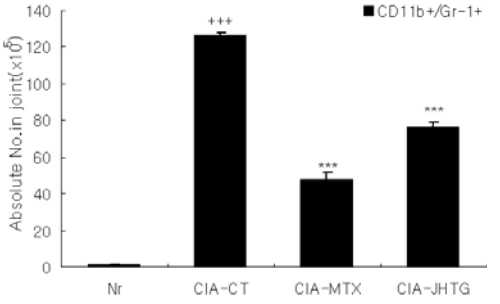

Fig. 19. Effects of JHTG on absolute number of CD11b+/Gr-1+ cells in paw joint of CIA mice.
Paw joint cells (x10^5 cells/ml) from paw joint were isolated following 4 weeks administration of JHTG. Cells were incubated with anti-CD11b+/Gr-1+ antibody and analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test(***p<0.001).

6. Rheumatoid factor(RF)에 미치는 영향

1) IgG 혈중 농도

IgG 혈중 농도는 정상군이 8.6 ± 4.0 (mU/㎖), 대조군이 207.3 ± 43.7 (mU/㎖), MTX 투여군이 106.0 ± 20.3 (mU/㎖), 실험군이 197.0± 48.8 (mU/㎖)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타냈으나, 실험군에서는 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 20).

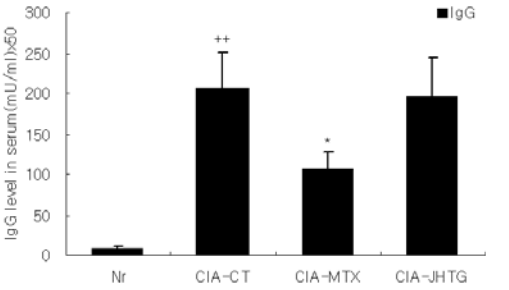

Fig. 20. Effects of JHTG on levels of total IgG in the serum of CIA mice.
Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal; by T test (++p<0.01). Statistically significant value compared with CT by T test(*p<0.05).

2) IgM 혈중 농도

IgM 혈중 농도는 정상군이 8.3 ± 3.1

(mU/mℓ), 대조군이 36.9 ± 2.5 (mU/mℓ), MTX 투여군이 31.2 ± 4.3 (mU/mℓ), 실험군이 6.4 ± 3.1 (mU/mℓ)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 약간 감소하였으나 유의성은 없었고, 실험군에서는 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 21).

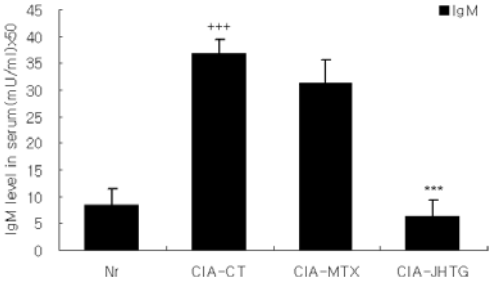

Fig. 21. Effects of JHTG on levels of total IgM in the serum of CIA mice.
Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test(***p<0.001).

7. 혈청 내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 1.1 ± 0.0 (U/mℓ), 대조군이 41.7 ± 0.9 (U/mℓ), MTX 투여군이 24.0 ± 2.5 (U/mℓ), 실험군이 37.6 ± 4.0 (U/mℓ)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타냈으나, 실험군에서는 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 22).

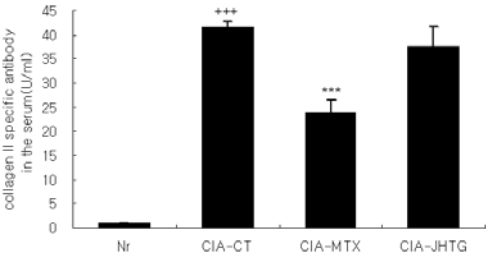

Fig. 22. Effects of JHTG on levels of collagen II specific antibody in the serum of CIA mice.
Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal; by T test (+++p<0.001). Statistically significant value compared with CT by T test(***p<0.001).

8. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, 全生活血湯加味方를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, monocytes, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다.

Fig. 23의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직의 파괴가 진행되었다. 반면, MTX 투여군(Fig. 23. C), 실험군 (10.2mg/day)(Fig. 23. D)에서는 대조군에 현저하게 관찰된 족부의 윤활관절강에서의 염증을 관찰할 수 없었고 상대적으로 감소하였다(Fig. 23).

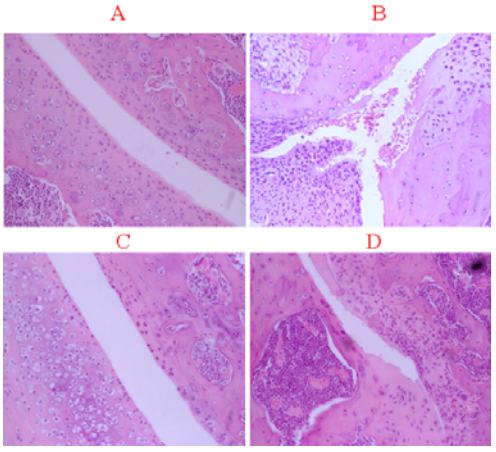

Fig. 23. Histological section of paw joints from CIA mice.
DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin.

2) Masson-Trichrome 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, 全生活血湯加味方를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다.

Fig. 24의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직에 collagen 침착이 진행되었고, 반면, MTX 투여군(Fig. 24. C), 실험군 (10.2mg/day)(Fig. 24. D)에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 24).

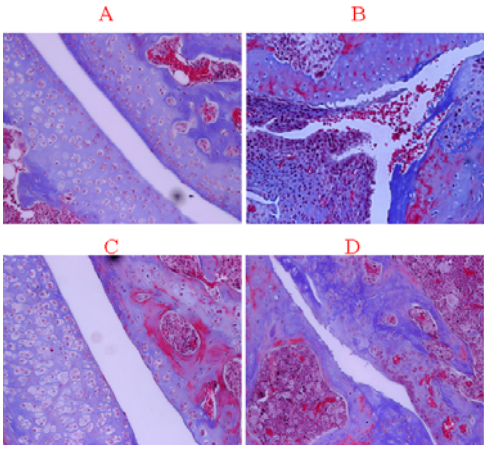

Fig. 24. Histological section of paw joints from CIA mice.

Ⅳ. 考　察

류마티스 관절염은 여러기관을 침범하는 전신성 질환이며, 가장 흔한 만성적인 염증성 질환으로 원인은 아직까지 불확실하다. 비록 여러 가지 전신증세가 나타나기는 하지만, 그 특징적인 양상은 말단관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염으로 대칭적인 분포 양상을 보이며, 활액막의 염증 및 증식으로 관절액이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하며 진행되고, 증식된 비정상적인 활액막과 2차로 발생된 육아조직에 의하여 관절의 연골 및 골, 그리고 관절 주위 조직이 침투되고 파괴되어 관절의 강직이나 변형이 속발될 수 있다[1,2,29].

류마티스 관절염의 유병률은 전세계적으로 다양하지만, 유럽에서는 0.8%, 중국에서는 0.2~0.93%, 국내는 2003년에 두 지역의 983명을 대상으로 1.4%의 유병률이 보고된 바 있으며, 전인구의 약 0.8%정도가 이환되어 있을 것으로 추정된다[2-5].

류마티스 관절염의 발생과 연관된 위험인자로는 유전적 위험인자인 감수성 유전자(susceptible genes)와 환경적인 위험인자가 제시되고 있으며, 환경적인 위험인자로 성별 및 호르몬, 감염, 사회경제적 환경 및 직업, 산업화 생활양식, 흡연 및 식이 등이 있다. 성별 및 호르몬 요인을 살펴보면, 여성에서 발병률이 높고, 초경전 여성에서 드문 것은 호르몬이 발생과 연관됨을 암시하며, 자연유산 및 사산 등의 임신 부작용이 발생위험인자로 보고되고 있다[5].

한의학 문헌에 있어서 류마티스 관절염에 해당하는 표현은 痺症, 痛痺, 歷節風, 白虎風, 鶴膝風, 風痺, 類風濕性關節炎등이 있으며, 그 중에서 痺症이 가장 包括的이면서 諸般 感覺運動障碍를 총칭한다 할 수 있고, 歷節風은 그 증상에 있어서 류마티스 관절염과 가장 유사하다 할 수 있다[13,14].

痺症과 歷節風에 관하여,《黃帝內經素問・痺論》[30]에서는 "風寒濕三氣雜至合而爲痺也"라 하여 痺症의 중요한 원인으로 風寒濕外邪를 언급했으며,《金匱要略・中風歷節病脈證幷治》[31]에서는 "短氣自汗出 歷節疼 不可屈伸 此皆飮酒汗出當風所致" 라 하여 歷節風의 원인을 氣血이 허약한 상황에서 風邪의 침입을 받아 발생한다 하였고,《諸病源候論》[32]에서는 "歷節風之狀 短氣自汗出 歷節疼痛 不可忍屈伸不得是也.", "由飮酒腠理開 汗出當風所致也……風冷搏於關節卽不可屈伸"이라 歷節風의 증상과 원인을 서술하였으며,《丹溪心法附餘》[33]에서는 "凡痺病……大率由痰 風熱 風濕 血虛",《景岳全書》[34]에서는 "諸痺者皆在陰分……故三氣得以乘之而爲此諸證"이라고 하여 평소 體虛하거나 眞陰衰弱, 精血虧損의 虛證이 있은 후에 風寒濕 外邪의 침입으로 痺症이 발생한다고 언급하고 있다.

이상을 종합하여 보면, 한의학에서는 痺症과 歷節風에 관하여 그 원인과 병리기전을 평소의 虛弱한 體質素因 및 病理的 狀況에 의한 氣血不足, 營衛不固, 肝腎不足등 虛證을 기반으로 外邪가 침입하여 발생하는 것으로 인식하고 있음을 알 수 있으며, 이는 류마티스 관절염의 위험인자로 유전적인자 및 감염, 흡연 및 식이요인, 임신 분만 등 환경적 인자가 제시되고 있는 점과 유사하다고 할 수 있다.

류마티스 관절염의 치료목적은 동통의 완화, 염증의 감소, 관절구조 보호, 기능 보존 및 전신침범을 조절하는데 있으며, 원인이 아직 명확히 밝혀지지 않았기 때문에 병리기전에 대하여 연구 중이며 따라서 많은 치료 약제의 작용기전이 불확실하고 경험적이다[2].

류마티스 관절염의 치료에 사용되는 약물들에는 비스테로이드성 항염제(NSAIDS), 질환변형 항류마티스 약제(Disease modifying anti-rheumatic drug, DMARDs), 저용량 스테로이드 호르몬 및 생물학적 약제 등이 있다[2,35,36].

DMARDs는 임상적 경험에 의해 류마티스 관절염의 경과를 변화시킨다고 밝혀진 약제로 methotrexate (MTX), 금(gold) 복합체, D-penicillamine, hydroxychroloquine (HCQ) 및 항말라리아제(antimalarials) 등이 사용되고 있으며 이중 엽산 길항제인 MTX가 가장 널리 쓰이는 약물이다[2,35,36].

MTX는 1980년대 중반에 류마티스 관절염 치료에 도입되어 사용되어온 약물

로 일차적 항류마티스 약제로 선택되고 있으나 심각한 간 독성, 폐 섬유화, 골수억제, 구내염 등 부작용을 초래할 수 있을 뿐만 아니라, 태아 기형을 유발할 수 있으므로 가임 여성에는 신중한 투여가 요구된다[2,15,35-37].

최근 한의학계에서도 류마티스 관절염의 치료에 관한 많은 면역학적 실험연구가 이루어져 왔으며, 龍膽瀉肝湯[19], 大羌活湯[20], 加味淸心蓮子湯[21], 加減木防己湯[22], 疏經活血湯加味[23], 加減補中益氣湯[24] 등이 각각 관절염 유발 모델에서 면역반응의 조절을 통하여 항관절염 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다.

全生活血湯은 李[16]의《蘭室秘藏・婦人門》에 "婦人分娩 及半産漏下 昏冒不省 瞑目無所知覺 盖因血暴亡 …… 分娩半産 本氣不病 是暴去其血 亡血補血 …… 今立一方 補血 養血 生血 益陽 以補手足厥陰之不足也."라 하여 最初로 收載된 이래 분만 후 실혈과다로 인한 産褥期의 發熱, 兩目眩眩, 四肢無力, 口乾, 頭暈, 行步欹側 등 血虛로 인한 産後風 증상에 사용된 處方이다[16-18].

全生活血湯加味方은 全生活血湯에서 藁本을 제외하고 豨薟, 鷄血藤, 玄胡索을 加味하여 産後에 발생한 관절통증의 치료에 사용하는 임상처방으로 白芍藥, 升麻, 防風, 羌活, 獨活, 柴胡, 當歸身, 葛根, 甘草, 川芎, 生地黃, 熟地黃, 蔓荊子, 細辛, 紅花, 豨薟, 鷄血藤, 玄胡索으로 構成되어 있으며 補血益陽, 祛風寒濕, 止痛의 效能으로 産後身痛 및 류마티스 관절염의 치료에 유효할 것으로 사료된다.

Steffen과 Timple[38]에 의해 collagen에 대한 면역학적 특이 반응이 류마티스 관절염의 유발과 악화에 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시된 이후, 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되었고[39,40], Trentham 등[41]에 의해서 흰쥐에서 typeⅡ collagen 접종으로 인한 관절염 모델이 확립된 이래, collagen 유발 관절염 모델은 임상적, 조직학적 및 면역학적으로 인간의 류마티스 관절염 모델로 주로 사용되고 있다.

이에 著者는 全生活血湯加味方의 면역기전 조절을 통한 항관절염 효능을 알아보기 위하여, DBA/1J 생쥐에 bovine typeII collagen을 피하 주사하여 collagen 유발 관절염을 유도시켜 관절염 유발율에 미치는 영향을 검사하고, draining lymph node(DLN)과 paw joint의 면역세포수, rheumatoid factor 분석, 혈청 내 collagen Ⅱ 항체 농도 측정, 병리조직 검사를 실시하였으며, 관절염에 대한 효과를 비교 평가하기 위하여 대표적인 항류마티스 약제인 MTX 투여군을 양성대조군으로 선정하였다.

먼저, 全生活血湯加味方의 안전성을 알아보기 위하여 세포독성 및 혈청 AST와 ALT에 미치는 영향을 측정하였다.

hFCs에 대한 세포독성은 실험을 수행한 각 농도에서는 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

간 기능 측정의 지표 성분인 AST는 정상군, 대조군, MTX 투여군, 실험군에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, ALT는 MTX 투여군에서 상승을 보였다(Fig. 2).

MTX 투여군에서 나타난 ALT의 상승은 MTX가 간독성을 나타내고 있음을 시사하며, 실험군은 AST, ALT 모두 큰 차이를 보이지 않아 간독성을 나타내지 않았다.

全生活血湯加味方이 관절염 유발율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여 1주 후에는 MTX 투여군과 실험군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였으나 유의성은 없었고, 2주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군만 유의한 감소를 보였으며 (*$p<0.05$), 3주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군에서는 유의한 감소를(**$p<0.01$), 실험군에서는 감소함을 보였으나 유의성은 없었으며, 4주 후에는 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군 모두 유의성 있는 (*$p<0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

이 결과로 全生活血湯加味方이 MTX처럼 신속한 효과를 나타내지는 않으나 투여 4주후에는 MTX보다 효과는 약하지만 유의한 관절염 유발 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

이러한 관절염 유발 억제 효과가 전신적인 면역반응 및 관절염 병소의 면역반응과 어떠한 관련이 있는지 알아보기 위하여 면역세포들의 집합 장소이며 통로인 림프절과 관절염의 주요 발병처인 관절내 면역세포의 변화를 관찰하였다.

먼저 draining lymph node(DLN) 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군에 비하여 대조군은 유의성 있는 감소를 나타내었으며(+++$p<0.001$), 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군에서 유의성 (*$p<0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 4).

Paw joint에서는 정상군에 비하여 대조군은 유의성 있는 증가를 나타내었으며(+++$p<0.001$), 대조군에 비하여 MTX 투여군 (**$p<0.01$)과 실험군 (*$p<0.05$)에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4).

이는 全生活血湯加味方이 MTX와 유사하게 림프절에서의 면역세포수는 증가시키며, 관절염 병소의 면역세포수는 감소시킨다는 것을 말해 준다.

면역세포는 종류나 분화단계에 따라서 특징적인 표면 단백질인 'CD 분자'를 발현하며, 각기 다른 부류의 면역세포들은 발현된 CD 분자에 의하여 구별할 수 있다[42].

B세포는 항체를 생산할 수 있는 유일한 세포로서 체액성 면역의 매개자로서 기능한다. T세포는 세포 내 미생물성 항원을 인식하며 이들 미생물 혹은 감염된 세포를 파괴하는 세포성 면역의 기능을 갖는다[42].

CD19는 B세포 계열로 운명이 결정된 가장 초기의 골수세포인 pro-B 세포에서부터 발견되는 표면 단백질로, 오직 B세포와 소포 수지상세포(follicular dendritic cells)에서 발현된다[42,43]. 소포 수지상세포는 항원제시 세포(antigen presenting cell, APC)인 수지상세포의 일종으로 표면에 B 세포 인식을 위한 항원을 제시하며 B세포의 선택과 활성화에 관여한다[42].

全生活血湯加味方이 DLN내 B세포의 수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 $CD19^+$ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 유의한 감소를 보였고 (+$p<0.05$), 대조군에 비하여 MTX 투여군 (*$p<0.05$)과 실험군 (**$p<0.01$) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 5).

CD3은 T세포 표면에서 발현되며, 항-CD3항체는 항원 특이성과 무관하게 혼합된 모든 T세포를 활성화시킨다[42]. 따라서 $CD3^+$ 세포수는 전체적인 T세포의

수를 의미한다고 할 수 있다.

全生活血湯加味方이 DLN내 T세포의 수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD3+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 (+$p<0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군 모두 유의성 (**$p<0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 6).

CD4와 CD8은 MHC(major histocompatibility complex)와 결합하여 T세포의 활성화 개시 신호를 전달하는 T 세포 단백질로서 한 세포에서 동시에 발현하지는 않는다. CD4는 classⅡ MHC 분자에 선택적으로 결합하며, 대부분의 CD4+ classⅡ 제한 T세포는 싸이토카인을 생성하는 helper T세포이다. CD8은 classⅠ MHC 분자에 선택적으로 결합하며, 대부분의 CD8+ classⅡ 제한 T세포는 cytotoxic T세포이다[42].

CD69는 말초혈액의 휴지기 T세포에서는 발현되지 않지만, T세포의 활성화가 일어나면 가장 먼저 세포표면에 발현이 되는 단백질로 T세포, B세포, NK 세포, 단핵구에서 발현되며, CD69+ T세포는 다양한 만성 염증질환에서 면역세포가 혈관을 통과하여 염증부위로 이동하는 단계에서 검출된다[44-46].

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD4+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD4+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++$p<0.01$) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (*$p<0.05$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 7).

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD3+/CD69+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD3+/CD69+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 대조군에 비하여 MTX 투여군만 유의성 (**$p<0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 8).

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD8+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD8+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++$p<0.01$) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (**$p<0.01$), 실험군 (*$p<0.05$) 에서 모두 유의성있는 증가를 나타내었다(Fig. 9).

CD25는 활성화된 T세포 및 B세포, 조절 T세포, 활성화된 macrophage에서 발현되는 표면 단백질로 IL-2에 결합하는 것으로 알려져 있다[42]. Collagen 유발 관절염 모델에서 CD4+/CD25+ 조절 T세포의 역할에 관한 연구에 의하면 CD4+ CD25+ 세포는 collagen 유발 관절염 병리과정 조절에 중요한 역할을 하고 있으며, CD25 항체로 유도된 CD25+ 세포고갈은 관절염증의 악화를 유발한다고 보고되었다[47].

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD4+/CD25+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++$p<0.01$) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (*$p<0.05$), 실험군 (**$p<0.01$) 에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 10).

CD49b는 혈소판, 활성화된 T세포, 단핵구, 일부 B세포에서 발현되는 표면 단백질로 collagen에 결합하여 세포외 바탕질에 백혈구를 부착시키는 데 관여하는

것으로 알려져 있다[42].

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD3+/CD49b+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD3+/CD49b+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (***p<0.001), 실험군 (*p<0.05)에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 11).

CD44는 성숙 T세포, B세포, 과립구와 적혈구등 여러 다양한 세포의 표면에서 발현되는 표면 단백질로 미감작 T세포보다 최근에 활성화된 T세포에서 더 많이 발현되고, 히알유론산에 결합하는 성질이 있어서 감염부위의 혈관 밖 조직에 T세포를 잔류시키는 기능을 하며, 염증부위와 점막조직에서 활성화된 T세포가 상피에 결합하도록 하는 역할을 한다[42].

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD4+/CD44+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (**p<0.01) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 12).

백혈구들은 표면에 인테그린(integrins)이라 불리며, 화학주성 사이토카인에 의해 활성화되는 부착 분자군을 발현한다. 모든 인테그린은 α와 β의 두개의 연결된 폴리펩티드 사슬로 구성되며, β 사슬에 따라 크게 구분된다. 이 중 β2 인테그린들은 림프구들이 항원제시세포, 상피세포와 같은 다른 세포와의 부착에 있어서 중요한 역할을 담당하며, CD11aCD18, CD11bCD18, CD11cCD18이 있다. CD11은 각기 다른 α 아단위 사슬을 의미하며 CD18은 공통의 β2 아단위를 의미한다. CD11c는 macrophage, 단핵구, 과립구, NK 세포의 표면에서 주로 발현되는 인테그린 사슬이다[42].

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD11c+/MHCⅡ+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD11c+/MHCⅡ+ 세포수를 절대 세포수로 산출한 결과, 각 군간에 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 13).

B220은 B세포의 성숙단계에 있어서 pre-B 세포에서부터 발현되며, CD23은 활성화된 B세포에서 발현된다[42].

全生活血湯加味方이 DLN에서 활성화 B세포인 B220+/CD23+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 B220+/CD23+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 모두 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 14).

全生活血湯加味方이 DLN에서 CD3+/CD8+ 세포수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DLN에서 CD3+/CD8+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 감소를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군 (***p<0.001), 실험군 (*p<0.05)에서 모두 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 15).

全生活血湯加味方이 관절염의 주요 발병처인 관절내 면역세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 먼저 paw joint에서 CD3+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의

한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 16).

Paw joint에서 CD4+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 17).

Paw joint에서 CD4+/CD25+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군과 실험군 모두 유의한 차이는 없었다(Fig. 18).

CD11b는 과립구, 단핵구, macrophage, NK 세포의 표면에서 주로 발현되는 인테그린 사슬로 macrophage 계열에서 나타나며, Gr-1은 과립구계열에서 나타나는 표면 단백질이다. CD11b와 Gr-1이 동시에 발현되는 세포를 골수성 억제 세포(myeloid suppressor cells, MSC)라 하며, 종양이 형성된 생쥐의 spleen과 항체형성, cytotoxic T세포 생성, 림프구의 증식을 억제하여야 할 필요가 있는 곳의 림프절에서 증가한다[42,48,49].

Paw joint에서 CD11b+/Gr-1+ 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군, 실험군에서 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 19).

이 결과로 全生活血湯加味方이 관절내에서 MTX와 유사하게 T세포의 수를 감소시키지만, CD4+/CD25+ 조절 T세포는 감소시키지 않고 있으며, CD11b+/Gr-1+ 과립구는 감소시킴을 알 수 있다.

성인형 류마티스 환자는 혈중에 자신의 IgG 분자의 Fc 분절과 반응하는 IgM 또는 IgG를 가지고 있다 이러한 자가항체를 류마티스 인자(rheumatoid factor, RF)라 부르며, 이의 존재 여부가 류마티스 관절염의 진단에 사용된다[42].

全生活血湯加味方이 CIA 모델에서 자가면역 항체의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청을 분석하였다.

IgG 혈중 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (++p<0.01) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 유의성 (*p<0.05) 있는 감소를 나타냈으나, 실험군에서는 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 20).

IgM 혈중 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 약간 감소하였으나 유의성은 없었고, 실험군에서는 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 21).

이 결과로 全生活血湯加味方은 MTX와 달리 혈청에서 IgG가 아닌 IgM을 감소시키고 있음을 알 수 있다.

全生活血湯加味方이 CIA 모델에서 collagen Ⅱ에 대한 항체형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈청 내 collagen Ⅱ의 항체량을 측정하였다.

Collagen Ⅱ 항체량은 정상군에 비하여 대조군에서 유의한 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, 대조군에 비하여 MTX 투여군은 유의성 (***p<0.001) 있는 감소를 나타냈으나, 실험군에서는 약간 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 22).

全生活血湯加味方이 관절에 미치는 조직학적 영향을 알아보기 위하여 CIA 생

쥐 모델에 4주간 MTX, 全生活血湯加味方을 투여하고, 관절을 적출하여 H&E 염색과 Masson-Trichrome 염색을 통하여 변화를 살펴보았다.

먼저 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, monocytes, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다.

Fig. 23의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직의 파괴가 진행되었다. 반면, MTX 투여군(Fig. 23. C), 실험군 (10.2mg/day)(Fig. 23. D) 에서는 대조군에 현저하게 관찰된 족부의 윤활관절강에서의 염증을 관찰할 수 없었고 상대적으로 감소하였다(Fig. 23).

Collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다.

Fig. 24의 B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직에 collagen 침착이 진행되었고, 반면, MTX 투여군(Fig. 24. C), 실험군 (10.2mg/day)(Fig. 24. D)에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 24).

종합해 보면 全生活血湯加味方은 MTX에 비하여 신속한 효과를 나타내지는 않으나 투여 4주후에는 MTX보다 효과는 약하지만 유의하게 관절염 유발을 억제하였으며, 면역세포의 발현에 있어서 MTX와 유사하게 림프절에서의 총 면역세포 증가, 관절에서 총 면역세포 감소, 림프절에서 B세포와 T세포의 증가, 활성화 T세포의 증가, 활성화 B세포의 감소 및 관절에서의 T세포 감소, 조절 T세포의 유지, 과립구의 감소를 나타내었고, 혈중 류마티스 인자 발현에 있어서는 MTX와 달리 IgM을 감소시켰으며, 관절 조직병리학적 검사에서 대조군에 비하여 유의한 효과를 나타냈다.

이 같은 결과는 全生活血湯加味方을 류마티스 관절염의 치료에 활용할 수 있는 근거를 제시하는 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結　論

全生活血湯加味方의 면역기전 조절을 통한 항관절염 효능을 알아보기 위하여, 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐의 관절염 유발을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제시켰다.
2. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 대조군에 비하여 DLN의 총 면역세포 수를 증가시켰으며, paw joint의 총 면역세포 수를 감소시켰다.
3. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 대조군에 비하여 DLN의 CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/25+, CD3+/CD49b+, CD4+/CD44+, CD3+/CD8+ 세포수를 유의성 있게 증가시켰다.
4. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 DLN의 CD3+/CD69+ 세포수를 대조군에 비하여 증가시켰으나 유의성은 없었고, CD11c+/MHCⅡ+ 세포수는 유의성 있는 변화가 없었다.
5. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생

쥐에서 DLN의 B220+/CD23+ 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.

6. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 대조군에 비하여 paw joint의 CD3+, CD4+, CD11b+/Gr-1 세포수를 유의성 있게 감소시켰으며, CD4+/25+ 세포수는 대조군에 비하여 감소시키지 않았다.
7. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 혈청 IgM은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰으나, 혈청 IgG는 대조군에 비하여 유의한 변화를 유발하지 않았다.
8. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 대조군에 비하여 혈청 collagen Ⅱ 항체량의 변화를 유발하지 않았다.
9. 全生活血湯加味方은 CIA DBA/1J 생쥐에서 관절 조직병리학적 검사에서 대조군에 비하여 유의한 효과를 나타냈다.

□ 투 고 일 : 2009년 4월 15일
□ 심 사 일 : 2009년 4월 29일
□ 심사완료일 : 2009년 5월 10일

參考文獻

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사. 1991;12, 13.
2. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회 역. Harrison's 내과학 16판(2권). 서울: MIP. 2006;2148, 2154-2156.
3. David F. Comparing the prevalence of rheumatic diseases in China with the rest of the world. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):106.
4. Qing YZ et al. Rheumatic Diseases in China. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R17.
5. 이준희, 김성일. 류마티스 관절염의 역학과 진단. Hanyang medical Reviews. 2005;25(2):4-12.
6. Tandon VR et al. Pregnancy and rheumatoid arthritis. Indian J Med Sci. 2006;60(8):334-344.
7. Kaaja RJ, Greer IA. Manifestations of chronic disease during pregnancy. JAMA. 2005;294(21):2751-2757.
8. Lansink M et al. The onset of rheumatoid arthritis in relation to pregnancy and childbirth. Clin Exp Rheumatol. 1993;11(2):171-174.
9. Silman A et al. Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1992;35(2):152-155.
10. Hazes JM. Pregnancy and its effect on the risk of developing rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1991;50:71-74.
11. Oka M. Effect of pregnancy on the onset and course of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1953;12(3):227-229.
12. Silman AJ. Is pregnancy a risk factor in the causation of rheumatoid arthritis? Ann Rheum Dis. 1986;45(12):1031-1034.
13. 이학인 등. 류마토이드 關節炎의 東西醫學的 考察. 濟韓東醫學術院論文集. 1999;4(1):199-209.
14. 이재동. 류마티스 관절염의 한방치

료. 경희의학. 2004;20(1):4-9.
15. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학(Ⅱ). 서울: 정담. 2007;78, 341, 342.
16. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울: 대성문화사. 1991;209.
17. 陳自明. 婦人良方校注補遺. 上海: 上海科學技術出版社. 1995;505.
18. 許浚. 原本東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1989;160.
19. 金度珉. 용담사간탕이 류마티스 관절염 유발 생쥐의 윤활관절막에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2008.
20. 안중혁, 이명종. 大羌活湯이 동물모델의 Carrageenan 유발 관절염에 미치는 영향. 韓方再活醫學科學會誌. 2006;16(2):79-96.
21. 片誠範. 加味淸心蓮子湯이 콜라겐 유발 관절염 모델에 미치는 효과. 대전대학교 대학원. 2006.
22. 황덕순 등. 加減木防己湯이 흰쥐의 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 대한한의정보학회지. 2005;11(1):58-73.
23. 李仲徽. Type II Collagen으로 誘發된 關節炎에 대한 疏經活血湯加味의 免疫 抑制 效果. 대전대학교 대학원. 2005.
24. 장선일, 윤용갑. DBA1J 마우스에서 加減補中益氣湯이 콜라젠 유도 관절염 억제에 미치는 효과. 大韓本草學會誌. 2003;18(3):143-151.
25. 김호현. 除痧湯이 류마티스성 관절염 완화에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2003;18(3):211-222.
26. 양동원 등. 加味疎風活血湯이 human fibroblast-like synoviocytes 내 염증유발 cytokine과 전사인자에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2003;24(3):84-95.
27. 임진섭, 이인선. 大防風湯 및 加味大防風湯이 Collagen誘發 關節炎에 미치는 影響. 韓方再活醫學科學會誌. 2001;11(3):125-134.
28. Papazisis KT et al. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. Journal of Immunological Methods. 1997;208(2):151-158.
29. 대한정형의학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 1999;175.
30. 楊維傑 編. 黃帝內經譯解(素問). 서울: 成輔社. 1980;328.
31. 張仲景 編. 仲景全書. 서울: 大星文化社. 1989;366.
32. 巢元方. 諸病源候論. 臺北: 照人出版公司. 1974;19.
33. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1982;206.
34. 張介賓. 景岳全書(上). 서울; 大星文化社. 1988;233.
35. 이연아, 홍승재. 류마티스 관절염의 최신치료 지견. 경희의학. 2007;23(1):7-14.
36. 민준기. 류마티스 관절염 치료의 최신지견. 대한내과학회지. 2002;63(부록2):S523-S528.
37. 대한산부인과학회. 산과학(제4판). 서울: 군자출판사. 2007;214.
38. Steffen C, Timple R. Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis area. Int Arch allergy. 1963;22:333-349.
39. Cheung HS et al. Identification of collagen subtypes in synovial fluid sediments from arthritic patients.

Am J Med. 1980;68:73-79.
40. Choi EK et al. Autoantibodies to type Ⅱ collagen occurrence in rheumatoid arthritis. autoimmune connective tissue disease and inflammatory syndromes. Ann Rheum Dis. 1988;47:313-322.
41. Trentham DE et al. Autoimmunity to type Ⅱ collagen, An experimental model of arthritis. J Exp Med. 1997 ;146:857-868.
42. 세포분자면역학 교재연구회 역. 세포분자면역학(6판). 서울: 이퍼블릭. 2008 ;11-13, 31-34, 145, 147, 148, 150, 172, 173, 441, 510, 531-536.
43. Tedder TF, Isaacs CM. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol. 1989;143 :712 - 717.
44. Testi R et al. T cell activation via Leu-23 (CD69). J Immunol. 1989;143 :1123 - 1128.
45. Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. Eur J Immunol. 1991;21(10):2317 - 2325.
46. Enric Esplugues et al. Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69. J Exp Med. 2003;197(9):1093 - 1106.
47. Steven KL et al. Cells of synovium in rheumatiod arthritis. T lymphocytes. Arthritis Rearches & Therapy. 2007 ;9:202.
48. Bronte V et al. Apoptotic death of $CD8^+$ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of $Mac-1^+/Gr-1^+$ cells. J Immunol. 1998;161(10):5313-5320.
49. Jin-Young Choi et al. Functional alterations in CD11b+Gr-1+ cells in mice injected with allogeneic tumor cells and treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. International Immunopharmacology. 2003;3(4):553-570.