

二妙散의 抗류마티즘 效能에 대한 研究

임창경, 윤용갑*

임창경한의원, *원광대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Anti-rheumatoid Arthritis Effects of *I-Myo-San* Water Extract

Chang-Kyung Lim, Young-Gab Yun*

Lim Chang Kyung Oriental Clinic, *Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University

Rheumatoid arthritis is characterized by focal loss of cartilage due to an up-regulation of inflammatory pathways, which produce pro-inflammatory mediators, such as interleukin-1(IL-1), tumour necrosis factor alpha(TNF- α), prostaglandin, and nitric oxide(NO). We investigated the anti-arthritis effects of water extracts from *Pellodendri cortex* and *Atractylodis rhizoma* *in vitro* and *in vivo*. Each extract suppressed the production of inflammatory mediators(NO, IL-1 β , TNF- α , and prostaglandin E₂) and the expression of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages in a dose-dependent manner. These suppressive effects were synergistically increased by their combination.

The same results were also observed in the rat osteoblast sarcoma cell line ROS17/2.8 stimulated with IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α . Moreover, the combination of these water extracts significantly suppressed collagen-induced mouse arthritis. These results suggest that the combination of water-extractable components of *Pellodendri cortex* and *Atractylodis rhizoma* may

-
- 교신저자 : 윤용갑
 - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 063-850-6834 E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr
 - 접수 : 2009/ 06/ 01 채택 : 2009/ 06/ 08

be useful for therapeutic drugs against rheumatoid arthritis, probably by suppressing the production of inflammatory mediators.

Key word : *I-Myo-San*, rheumatoid arthritis, *Pellodendri cortex*, nflammatory mediators, *Atractylodis rhizoma*

1. 緒 論

二妙散¹⁾은 蒼朮과 黃柏 各 等分으로 구성된 處方으로써 『丹溪心法』에 濕熱로 인한 각종 疾病을 치료하는 方劑로 수록된 이래 後代 많은 醫家²⁻¹²⁾들에 의하여 사용되어 왔다.

그 내용을 살펴보면 濕熱痿病에는 加味四物湯, 清燥湯, 三妙丸, 四製蒼朮丸을 사용하였고, 濕熱脚氣에는 二炒蒼朮散, 清熱瀉濕湯, 加味蒼朮散을, 歷節風에 는 疏風活血湯, 蒼朮復煎散을 사용하였으며, 濕熱痔漏에는 秦艽蒼朮湯을, 濕熱腰痛에는 七味蒼朮散을, 濕熱帶下에는 蒼柏樗皮丸을, 濕熱肢體痛에는 蒼朮復煎湯, 蒼朮復煎散²⁾을 사용하였다¹⁴⁻¹⁸⁾. 또한 熱厥, 痰厥, 厥逆頭痛에는 清上瀉火湯, 半夏白朮天麻湯, 羌活附子湯을, 皮膚瘡에는 消疳敗毒散, 剪草散, 酒歸飲 등의 基本方으로 使用하고 있다. 이것으로 보아 濕熱은 皮膚, 粘膜, 筋骨格系, 神經系 등의 炎症性 病變을 유발시키는 原因을 통칭하는 用語임을 알 수 있다.

특히, 二妙散은 筋肉과 骨格의 交원, 결합조직에서 생기는 病症을 치료하는 清熱瀉濕湯, 三妙丸, 疏風活血湯, 清燥湯, 二炒蒼朮散, 蒼朮復煎散, 滋血養筋湯, 養血壯筋健步丸 등의 중요한 基本方²⁶⁾으로 活用되고 있음을 착안하여 二妙散과 構成藥物이 rheumatoid arthritis에 미치는 영향을 실험적으로 연구하였다.

Rheumatoid arthritis는 結締組織을 광범위하게 侵犯하는 慢性的이고 全身的인 疾患이다²⁸⁾. 대개 40~50대에 시작되며, 세계 어느 곳에서나 발생하며 남성보다 여성에게 2~3배 높은 발생을 보이며, 주요특징은 rheumatoid arthritis 여러 관절의 염증이며, 특히 관절을 침범하며 關節軟骨과 骨에 非可逆的인 손상을 주어 關節變形 機能障礙 身體障礙를 초래한다²⁵⁾.

이러한 rheumatoid arthritis는 다양한 현상으로 기인하지만 공통점이라고 할 수 있는 것은 면역세포 및 대식세포가 혈관을 통한 혈액 유도를 통해 articular cartilage와 synovial joint에서의 지속적인 염증 반응을 유발하는 것이 병리적인 이유라고 할 수 있으며 결국에는 synovial fluid의 파괴와 cartilage의 소멸이 나타나게 된다.

최근에 rheumatoid arthritis가 형성되는 주요한 원인으로 nitric oxide(NO), 다양한 pro-inflammatory cytokine(interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6) 그리고 tumor necrosis factor- α (TNF- α)) 등과 같은 cytokine의 증가로 인한 iNOS의 발현 증가와 강력한 염증반응이 그 원인으로 알려져 있다^{29,30)}. 또한 *in vivo*에서도 이러한 물질들이 human osteoarthritic과 rheumatoid joints 내에 국부적으로 생산되어 축적된다는 보고가 있다³⁵⁾.

NO는 생체 내에서 NO synthase(NOS) 라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유 라디칼이다. NO는 생리

적인 현상인 혈압조절과 신경전달 매개체로 작용하며, 면역반응에 중추적인 역할을 하고 있으며 뼈를 형성하는 chondrocyte와 synoviocyte 같은 세포에서도 NO를 생성하는 효소가 발견이 되고 있다. 하지만 최근에는 관절에서 과량의 NO 생성이 염증반응을 일으키고, 조직의 파괴 및 면역 체계의 이상을 유발하는 것으로 나타난다고 보고되고 있다³¹⁾.

따라서 이들 매개체의 생성을 효과적으로 억제하면 rheumatoid arthritis 등과 같은 염증 질환을 치료 할 수 있다는 관점에서 천연물을 이용한 rheumatoid arthritis의 치료제 개발을 시도하고 있다.

최근 rheumatoid arthritis치료에 효과가 있는 천연 생리활성물질 들이 보고되고 있으나 어떠한 기전에 의하여 이러한 효과를 나타내는 지는 분명하게 알려져 있는 것은 없고, 高 효능의 치료제가 아직까지 확인된 것은 없다.

본 연구에서는 二妙散과 그 구성약물인 黃栢(*Pellodendri cortex*)과 蒼朮(*Atractylodis rhizoma*)의 anti-rheumatoid arthritis 효과를 쥐의 대식세포와 연골세포 및 동물 실험을 통하여 연구하였다.

二妙散과 그 구성약물인 蒼朮, 黃栢이 iNOS의 발현에 의한 NO의 생성에 미치는 영향과, rheumatoid arthritis유발 원인으로 알려진 다양한 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 그리고 prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성에 미치는 영향 및 관절염의 동물모델 실험을 통하여 ankylosis를 관찰한 결과를 보고하고자 합니다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용한 처방은 蒼朮(*Atractylodis rhizoma*)과 黃栢(*Pellodendri cortex*)이 같은 분량으로 배합된 二妙散과 蒼朮, 黃栢을 사용하였다. 蒼朮과

黃栢 각 100 g씩에 물을 각각 600 ml씩을 부어서 100℃온도로 대용약탕기(DWP-1800T)를 이용하여 2시간 30분 동안 煎湯하였다.

二妙散은 蒼朮 50 g, 黃栢 50 g에 물 600 ml를 부어서 같은 방법으로 煎湯하였다. 이와같이 煎湯한 蒼朮 추출액 125 ml, 黃栢 추출액 150 ml, 二妙散은 200 ml를 동결 건조하여 蒼朮 15.5 g, 黃栢 7.3 g, 二妙散 12.7 g을 얻어서 실험에 사용 하였다.

2. 세포배양

대식세포는 murine macrophage cell line RAW264.7 과 rat osteoblast sarcoma cell line인 ROS17/2.8를 이용하였다. RAW264.7와 ROS17/2.8은 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 그리고 한약제의 처리는 5%의 FBS을 함유한 DMEM 배지를 이용하였다.

대식세포는 10 μ g/ml의 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화시키고, ROS17/2.8는 cytokine mixture (CM:100 U/ml IL-1 β , 200 U/ml IFN- γ 그리고 500 U/ml TNF- α)로 활성화시키고 동시에 실험 약제를 첨가하였다.

3. Nitrite, cytokine 그리고 PGE₂의 측정

Nitrite의 측정은 세포배양액 100 μ l에 동량의 Griess reagent(0.1% naphthylethyenediamine dihydrochloride in H₂O:1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄= 1:1)를 첨가하여 조심스럽게 혼합한다. 약 5분이 경과한 후, 색깔의 변화를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도 변화로 측정하였다.

Nitrite농도는 NaNO₂ 표준용액을 이용하여 만든 표준커브로부터 계산하였다. nitrite+nitrate(NO_x)는 nitrite reductase를 이용한 assay kit를 이용하였다. cytokine과 PGE₂의 양은 상업적으로 구입한 분석 kit를 이용하여 측정하였다.

4. Western Blot 실험방법

세포를 20 mM Tris-HCl 완충용액(0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstain A, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chymostatin)에 현탁시키고 세 번의 freezing-thawing cycle로 파쇄하였다.

세포질 용액은 4°C 에서 13,000g로 20분간 원심 분리 한 후 상등액으로 부터 얻었다. 세포질 용액(40 μg 단백질)을 8% SDS-PAGE에서 전기영동하고, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. Membrane을 5% skim milk를 함유한 PBS-Tween으로 세척하고, iNOS 혹은 cyclooxygenase-2 항체로 1시간 동안 hybridization하고 3회 세척하였다.

Membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated 된 anti-mouse IgG로 다시 1시간 동안 상온에서 hybridization 한다. Membrane을 PBS-Tween으로 4회 세척한 후 chemiluminescence 시약(ECL)으로 반응시킨 후 X-ray film으로 감광시켜 특정 유전자의 단백질 band를 가시화 하였다.

5. 二妙散에 의한 rheumatoid arthritis억제 효과

관절염 유발 : 동물 실험은 DBA/1J 생쥐를 이용한 collagen-induced arthritis(CIA) 모델을 이용하였다. 4°C에서 bovine type II collagen(CII)를 10 mM 초산액에서 하룻밤 교반하여 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CII용액을 만들었다. CII용액을 동량의 complete Freund's adjuvant(CFA)와 혼합하여 CII/CFA를 조제하였다. DBA/1J 생쥐 (Daehan Biolink, 6-8 week-old male)의 꼬리에 CII/CFA 혼합액 100 μl (CII 100 μg + CFA 100 μg)을 26G needle을 사용하여 피하주사 하였다³⁸⁾.

1차 주사후 20일이 경과되면 CII/CFA를 생쥐 꼬리의 피하에 2차 주사 하였다. 二妙散은 1차 주사 후 15일부터 40일까지 투여하였다. 1차 주사후 28일이 경과되면, 40 μg 의 LPS(Sigma)를 복강에 주사하여 arthritis의 유발을 가속시켰다³⁷⁾. 관절염

억제효과는 15일부터 50일 까지 매주 3회씩 서로 다른 두 명의 관찰자가 시행하였다.

Incidence of arthritis : CIA모델에서 약물을 처리한 group과 처리하지 않은 group간의 paw에 arthritis가 발생하는 생쥐의 숫자를 백분율로 표시하였다.

Arthritis Index : CIA모델에서 paw에 나타나는 부종과 종창정도를 관찰하여 관절염의 발생 빈도와 위중도(severity)를 paw에서 측정하고, 평균값을 산출하였다³⁶⁾.

0 점 : 부종이나 종창이 없다.

1 점 : mid foot 혹은 ankle joint에 국한된 경한 부종과 발적

2 점 : 발목관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적

3 점 : 발목관절에서 metatarsal bone에 걸친 중등도의 부종과 발적

4 점 : 발목에서 digit 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

Incidence of ankylosis : Ankylosis는 관절염의 진행과정에 나타나는 현상이다.

그러므로 二妙散 처리시 ankylosis의 발생빈도(incidence)를 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

III. 실험 결과

1. 二妙散 및 구성약물(蒼朮과 黃栢)의 대식세포로부터 NO 생성 및 iNOS 발현 억제에 대한 효과

대식세포를 LPS로 처리시 NO의 생성은 전사 수준에서 발현이 조절되는 iNOS mRNA 정도에 비례하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

본 연구에서는 대식세포 RAW264.7세포를 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 활성화시킴과 동시에 二妙散과 蒼朮과 黃栢을 처리하고, 18시간이 경과한 후 생성된 NO의 양을 측정하였다. LPS로 활성화된 RAW264.7

세포는 40 μM 정도의 NO를 생성하였으며, 蒼朮과 黃栢을 처리하였을 때 NO의 생성이 처리된 약의 농도에 비례하여 억제됨을 관찰하였다.

二妙散을 처리시에도 NO의 생성이 농도에 의존적으로 억제되었으며, NO 생성에 대한 蒼朮과 黃栢의 IC_{50} 은 0.2와 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 각각 나타나 蒼朮이 黃栢보다는 NO생성의 억제효과가 높은 것으로 밝혀졌다(Fig. 1).

二妙散의 IC_{50} 은 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 蒼朮과 黃栢을 각각 사용한 효과보다 매우 강한 상승효과를 보였다. 이러한 결과는 蒼朮이 黃栢보다 항염 효과가 더 좋다는 것이 의미하며, 또한 二妙散이 抗炎症 효과가 더욱 상승하고 있음을 보여 주고 있다(Fig. 1).

대식세포에서 NO의 생성은 iNOS 단백질의 발현에 의하여 일어나므로, 상기와 동일 실험 조건에서 iNOS의 발현 변화를 Western blot으로 확인하였다.

iNOS의 발현은 蒼朮, 黃栢, 二妙散의 처리 농도에 따라 점차적으로 감소함을 보여주고 있다(Fig. 2A).

또한, 二妙散은 蒼朮, 黃栢을 단독으로 각각 처리하였을 때 보다 iNOS발현이 현저하게 감소함을 보여주고 있다(Fig. 2 A와 B).

蒼朮, 黃栢, 二妙散에 의한 NO 생성 억제 효과는 iNOS 발현을 전사단계에서 억제하기 때문이며, 二妙散이 구성약물인 蒼朮, 黃栢 보다 강한 항염 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다.

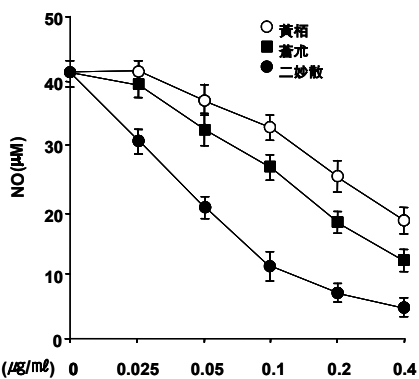


Fig. 1. The effects of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San*

on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were treated with LPS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma* and *I-Myo-San* for 18 h. NO production was measured in the culture medium by Griess reagents.

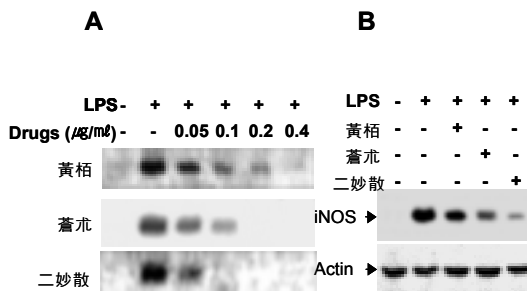


Fig. 2. Inhibitory effects of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* on iNOS expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

(A) RAW264.7 cells were treated with LPS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of the extracts of *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* for 12 h. Cells were washed with ice-cold saline and lysed by three cycles of freezing and thawing. Cytosolic extracts were prepared by centrifugation at 12,000 $\times g$ for 20 min. Cytosolic proteins(50 μg) were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. The protein levels of iNOS were measured by Western blot analyses using antibody against mouse iNOS.

(B) RAW264.7 cells were treated with LPS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of the extracts(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Pellodendri cortex*,

Atractylodis rhizoma, and *I-Myo-San* for 12 h. The protein level of iNOS was determined by Western blot analysis.

The blot was rehybridized with actin antibody to verify equal loading of protein in each lane.

2. 二妙散 및 구성약물(蒼朮과 黃栢)의 대식세포로부터 cytokine 생성에 미치는 효과

Rheumatoid arthritis질환의 유발 원인 중에 하나가 관절내의 대식세포 활성화에 의한 다양한 염증 매개 인자인 cytokine의 발현과 생성에 기인하고

있다³²⁾.

따라서 二妙散과 그 구성약물이 활성화된 대식 세포에서 cytokine의 생성 억제효과를 조사하기 위하여, RAW264.7 세포(2x10⁶ cells/2 ml/well of 6 well-plate)를 LPS(10 µg/ml)와 실험 약제를 동시에 처리하고, 18시간이 경과한 후 생성된 IL-1β, IL-6 그리고 TNF-α의 양을 kit를 이용하여 측정하였다.

LPS로 활성화한 대식세포는 IL-1β, IL-6 그리고 TNF-α를 다량 생성하였고, 蒼朮과 黃栢을 각각 처리 하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제 되었으며, 二妙散도 이들 cytokine들의 생성을 강하게 억제하는 상승효과를 보여주었다(Fig. 3).

이러한 결과는 蒼朮과 黃栢이 염증매개 인자인 cytokine의 생성을 억제하므로써 관절염의 유발이나 진행을 억제할 수 있음을 그대로 보여주고 있으며, 이들 약제의 혼합인 二妙散은 이와 같은 작용에 대한 상승효과를 주고 있는 것으로 보아 관절염과 같은 염증질환을 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

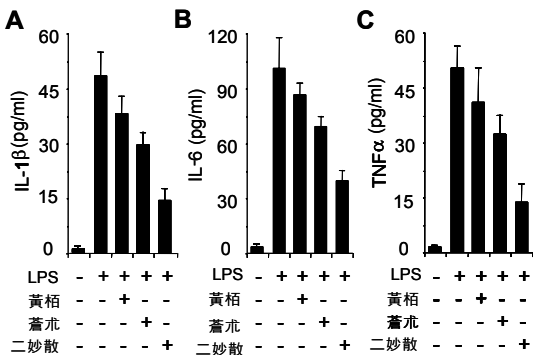


Fig. 3. The effects of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* on cytokine production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were treated with LPS(10 µg/ml) in the presence or absence of the extracts(0.1µg/ml) of *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* for 18 h. The levels of IL-1β(A), IL-6(B) and TNF-α(C) were measured in the culture medium using ELISA kits.

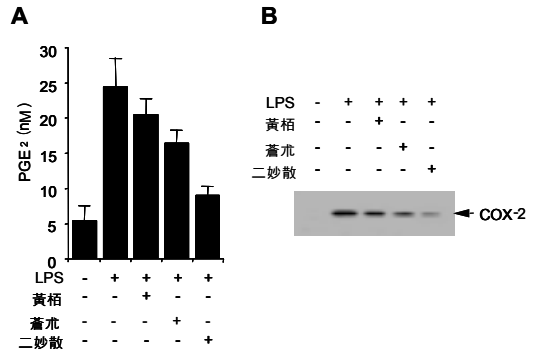


Fig. 4. The effects of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* on PGE₂ production and cyclooxygenase-2 expression.

RAW264.7 cells were treated with LPS(10 µg/ml) in the presence or absence of water extracts(0.1 µg/ml) from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* for 18 h.

(A) PGE₂ production was measured in the culture medium using an ELISA kit.

(B) Cells were lysed by three cycles of freezing and thawing, and cell extracts were obtained by centrifugation. The levels of cyclooxygenase-2 protein were determined by Western blot analysis.

3. 二妙散 및 구성약물(蒼朮과 黃栢)의 대식 세포로부터 PGE₂ 생성에 미치는 효과

관절 활막액에서 불포화지방산으로부터 생성되는 PGE₂는 염증의 유발 물질이며, 관절염의 유발 원인이기도 하다. 따라서 본 연구에서는 二妙散과 구성약물인 蒼朮과 黃栢이 PGE₂의 생성 억제효과와 이를 생성하는 유도성 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 억제효과를 조사하였다.

대식세포인 RAW264.7 세포를 LPS로 활성화시키면 PGE₂의 생성이 증가하는데, 여기에는 蒼朮과 黃栢을 처리하면 증가된 PGE₂는 감소하였다. 또한, 二妙散을 처리하면 PGE₂의 생성 억제효과가 더욱 강하게 나타났다(Fig. 4A). 한편 PGE₂ 생성을 유도하는 COX-2의 발현은 LPS에 의하여 증가되는데 이와 같이 증가된 COX-2의 발현은 蒼朮과 黃栢의 처리에 의하여 감소하고 있음을 확인

되었다. 더 나아가서 이 효소의 발현은 二妙散의 처리에 의하여 강하게 억제됨을 확인하였다(Fig. 4B). 이러한 결과는 二妙散과 구성약물인 蒼朮과 黃柏이 COX-2의 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생성을 억제할 수 있으며, 蒼朮과 黃柏을 혼합한 二妙散을 사용하면, 더욱 더 강한 염증 억제 효과를 나타낼 수 있음을 시사하고 있다.

4. 二妙散 및 구성약물(蒼朮과 黃柏)이 rat의 조골세포로부터 NO 생성에 미치는 효과

관절염의 유발은 대식세포에 의해서만 유발되고 진행되는 것이 아니고, 다양한 세포가 관련된 복잡한 과정에 의하여 진행되고 있다³²⁾.

Rheumatoid arthritis의 유발 및 진행과정에는 osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts 그리고 Th1/Th2 cells이 관여하고 있다. 따라서 본 연구에서는 rat osteoblast sarcoma cells인 ROS17/2.8에서 NO의 생성에 미치는 二妙散 및 구성약물인 蒼朮과 黃柏의 효과를 조사하였다.

ROS17/2.8 세포를 CM(100 U/ml IL-1 β , 200 U/ml IFN- γ 그리고 500 U/ml TNF- α)으로 활성화 시키면 NO의 생성이 증가하였고, 蒼朮과 黃柏을 처리하면 NO의 생성이 억제되었다.

더 나아가서 二妙散을 처리하면 ROS17/2.8 세포로부터 생성되는 NO는 현저하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 5A). 또한, CM에 의한 iNOS의 발현이 蒼朮과 黃柏에 의하여 억제되었고, 二妙散은 매우 효과적으로 iNOS의 발현억제를 보여 주었다(Fig. 5B).

이러한 결과는 二妙散과 蒼朮과 黃柏이 rheumatoid arthritis의 유발과 진행의 원인이 되는 세포의 활성화를 억제하여 NO와 같은 염증 매개인자의 생성을 억제함으로써 rheumatoid arthritis를 치료할 수 있음을 제시하고 있다.

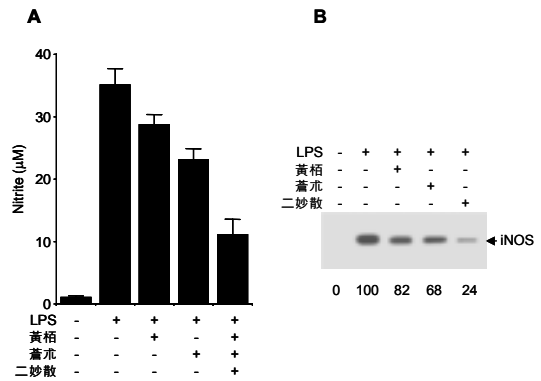


Fig. 5. The effects of water extracts from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San* on NO production and iNOS expression in immune-activated ROS17/2.8 cells.

The rat osteoblast sarcoma cell ROS17/2.8 was stimulated with cytokine mixture(CM:100 U/ml IL-1 β , 200 U/ml IFN- γ and 500 U/ml TNF- α)in the presence or absence of water extracts(0.1 μ g/ml) from *Pellodendri cortex*, *Atractylodis rhizoma*, and *I-Myo-San*.

(A) After 72 h culture, NO production was measured in the cultured medium by Griess reagents.

(B) After 48 h culture, cell extracts were prepared by the same method as in Fig. 2. The iNOS protein level was determined by Western blot analysis.

5. 二妙散의 collagen-induced arthritis(CIA)에 대한 효과

CIA 모델에서 二妙散의 관절염 예방 효과를 연구하기 위해서 CII/CFA를 injection후 15일부터 42일까지 二妙散 20 mg/kg을 DBA/1J mice의 복강에 하루에 1회 투여하고, 관절염의 평가는 첫 주사 후 16일부터 50일 까지 일주에 3회씩 incidence of arthritis를 측정 하였다. CII/CFA를 주사 한 후 30일부터 증상이 나타나기 시작해서 35일경이 되면 100%발병하는 것을 관찰되었고 (data not shown), 二妙散을 투여한 group의 mice paw에 나타나는 부종과 종창정도의 위중도 (arthritis index)는 collagen만 처리한 대조군에 비하여 약 50%정도가 감소되었다(Fig. 6A).

Fig. 6B는 arthritis의 정도를 보여 주는 사진으

로 二妙散을 투여시 부종의 정도가 감소함을 보여 주고 있다. Ankylosis의 발생은 二妙散을 투여시 대조군에 비하여 70% 정도 감소되었다(Fig. 6C).

이러한 결과는 collagen 투여로 유발되는 관절염 모델에서 二妙散이 관절염의 진행을 억제할 수 있음을 제시하고 있다.

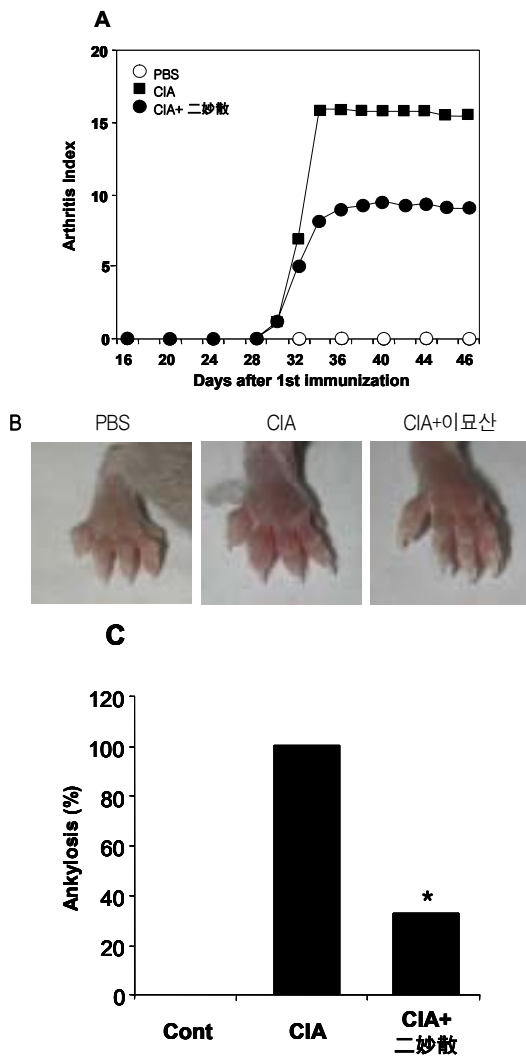


Fig. 6. The effects of water extract from *I-Myo-San* on Collagen-induced arthritis.

DBA/1J mice were immunized with type II bovine collagen at the base of the tail on days 0 and 21, as

described in the section of Materials and Methods. At day 15 after the first immunization, mice were injected i.p. with saline or the extract (20 mg/kg) of *I-Myo-San* daily. Each column represents the mean from n=5 mice. * = p<0.01 compared with the control group.

(A) Percentage of mice that developed arthritis.

(B) Hind paws were photographed using a digital camera at day 35 following the first immunization.

(C) The degree of ankylosis was determined at day 35 following the first immunization.

IV. 考 察

Rheumatoid arthritis는 neutrophils, macrophages, fibroblasts 등에서 분비된 cytokines이나 성장인자에 의해 synoviocytes, 면역세포, osteoblasts 및 chondrocytes가 활성화되고 이들 세포의 활성화는 활액막의 이상증식 및 cartilage의 파괴를 통해 rheumatoid arthritis를 유발시킨다²⁸⁾.

Rheumatoid arthritis의 초기에는 활막세포의 증식과 미세혈관의 손상, 모세혈관정맥 주위의 T-임파구의 침윤, T-임파구에서 분비되는 cytokine에 의해 활액막의 증식과 염증반응 등이 일어나게 된다. 관절염의 유발에 관여하는 면역활성 조절 및 염증매개 인자인 cytokines에는 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 등이 있다. 이러한 cytokine들은 다양한 세포들을 활성화시키며 유해산소 그리고 NO등의 생성을 증가시켜 연골조직을 지속적으로 파괴하여 관절염의 진행을 촉진시키는 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

Rheumatoid arthritis의 치료제는 1970년대부터 서서히 개발되기 시작하여 유기 합성적인 방법으로 혹은 천연 생리 활성물질을 이용하여 다양한 방법으로 널리 알려지고 있다^{27,33)}. 그러나 이러한 유기 합성으로 만들어진 약제들 중에 하나인 non-steroidal anti-inflammatory agents(NSAID) 등이 널리 사용되고 있지만 이러한 약제의 가장 큰 문제는 부작용(위장관 출혈, 항응고작용 (bleeding disorder), 수분저류 등)이 심하게 따른다는 것이다. 또한 steroid 제제는 단기간 사용에는 효과적이거나 장기

간 사용시 체중증가, 반월형 안면, 뼈 및 피부의 얇아짐, 여드름, 녹내장, 고혈압, 당뇨질환, 감염 및 위궤양을 유발하여 장기간 사용이 어려운 실정이다.

최근, 선진국에서는 rheumatoid arthritis의 치료 효과는 크고 부작용이 최소화된 약제 개발을 위하여 다양한 노력을 경주하고는 있으나 현재까지 뚜렷한 약물을 개발하지 못하고 있는 실정이다.

이러한 관점에서 천연물을 이용한 rheumatoid arthritis 치료제 개발을 韓醫學의 개념을 도입한 방제학에서의 君臣佐使 理論에 관련된 二妙散을 이용하여 *in vitro* 와 *in vivo* 실험을 시행하였다.

二妙散은 蒼朮과 黃栢이 等分으로 구성된 方劑로써 丹溪心法에 수록된 이래 여러 처방에 配合하여 사용되어 왔으며 주로 濕熱을 除去하고 痛風, 筋骨의 疼痛에 활용하였고¹³⁾, 足痿軟無力과 足膝紅腫熱痛, 濕熱帶下, 瘡毒, 小便短小, 神經性皮炎, 關節炎, 瘡癢, 足癰에 사용하여 왔다¹⁹⁾.

蒼朮과 黃栢의 效能과 藥理作用을 보면¹⁹⁻²⁵⁾ 다음과 같다.

蒼朮(*Atractylodis rhizoma*)은 菊花科에 屬한 잡주의 根莖을 말하며 燥濕健胃와 去風濕, 解諸鬱 效能이 있고 藥理作用은 血糖을 降下 시키며, 鎮靜作用, 抗菌作用이 있는 것으로 보고되고 있다.

黃栢(*Pellodendri cortex*)은 山椒科인 황벽나무의 樹根皮를 말하며 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 淸腎火, 補腎陰 效能이 있고 藥理作用으로는 抗病原微生物作用, 降血壓作用, 胃潰瘍이나 肝炎治療作用이 있고, 鎮咳祛痰作用, 腸管收縮作用, 皮膚真菌抑制作用, 子宮頸部癌 抑制作用이 있는 것으로 알려져 있다.

한편 濕熱에 의한 각종 질병을 치료하는 基本方劑인 二妙散이 사용된 내용을 살펴보면 다음과 같다. 즉 濕熱痿痺에는 加味四物湯, 淸燥湯, 三妙丸, 四製香附丸을 사용하였고 濕熱脚氣에는 二妙蒼栢散, 淸熱瀉濕湯, 加味蒼栢散을, 歷節風에는 疎風活血湯, 蒼朮復煎散을 사용하였으며, 濕熱痔漏에

는 秦芫蒼朮湯을, 濕熱腰痛에는 七味蒼栢散을, 濕熱帶下에는 蒼栢栲皮丸, 濕熱肢節痛에는 蒼朮復煎湯, 蒼朮復煎散²⁾을 사용하였고 熱厥, 痰厥, 厥逆頭痛에는 淸上瀉火湯, 半夏白朮天麻湯, 羌活附子湯을, 皮膚瘡에 消疳敗毒散, 剪草散, 酒歸飲을 사용하였다. 그러므로 二妙散은 濕熱과 깊은 연관성이 있으며 濕熱은 皮膚, 粘膜, 筋骨格系, 神經系 등의 炎症性 病變을 유발케하는 原因을 통칭하는 용어로 볼 수 있다. 특히 二妙散은 筋肉과 骨格의 病因, 결합조직에서 생기는 病症을 治療하는 淸熱瀉濕湯, 三妙丸, 疎風活血湯, 淸燥湯, 二妙蒼栢散, 蒼朮復煎散, 滋血養筋湯, 養血壯筋健步丸 등의 重要한 基本方이다. 따라서 二妙散과 構成藥物이 rheumatoid arthritis와 깊은 관련성이 있음을 착안하여 본 연구를 시도하였으며, 그 내용을 살펴보면 다음과 같다.

대식세포를 LPS로 처리 하였을 때에 NO의 생성은 전사 수준에서 발현이 조절되는 iNOS mRNA 정도에 비례하는 것으로 알려져 있다. 따라서 대식세포 RAW264.7세포를 LPS로 활성화시킴과 동시에 二妙散과 蒼朮과 黃栢을 처리하고 NO의 양을 측정하여 보면, 二妙散과 그 구성인 蒼朮, 黃栢이 모두 NO생성을 억제하였으며, 蒼朮이 黃栢보다 강한 억제 효과를 나타내었다. 또한 二妙散이 蒼朮과 黃栢을 각각 사용한 것보다 매우 강한 NO생성 억제에 대한 상승효과를 보였다. 이러한 결과는 蒼朮이 黃栢보다 항염 효과가 더 좋다는 것이 의미하며, 二妙散이 抗炎症效果가 더욱 상승하고 있음을 보여 주고 있다(Fig. 1).

대식세포에서 NO의 생성은 iNOS 단백질의 발현에 의하여 일어나므로, 상기와 동일 실험 조건에서 iNOS의 발현 변화를 Western blot으로 확인하였다.

iNOS의 발현은 蒼朮, 黃栢, 二妙散의 처리 농도에 따라 점차적으로 감소함을 보여주고 있으며 (Fig. 2A), 二妙散은 蒼朮, 黃栢을 단독으로 각각 처리하였을 때 보다 iNOS발현이 현저하게 감소함

을 보여주고 있다(Fig. 2 A와 B).

이러한 실험 결과는 蒼朮, 黃栢, 二妙散에 의한 NO 생성 억제 효과는 iNOS 발현을 전사단계에서 억제함으로 기인되고 二妙散이 蒼朮, 黃栢보다 강한 항염 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다.

Rheumatoid arthritis질환의 유발 원인 중에 하나가 관절내의 대식세포 활성화에 의한 다양한 염증 매개 인자인 cytokine의 발현과 생성에 기인하고 있다.

따라서 二妙散과 그 구성약물인 蒼朮과 黃栢이 활성화된 대식세포에서 cytokine의 생성 억제효과를 조사하기 위하여, RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리한 결과 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 를 다량 생성하였고, 蒼朮과 黃栢을 각각 처리 하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제되었으며, 二妙散도 이들 cytokine들의 생성을 강하게 억제하는 상승효과를 보여주었다(Fig. 3).

이러한 결과는 蒼朮과 黃栢이 염증매개 인자인 cytokine의 생성을 억제하여 관절염의 유발이나 진행을 억제할 수 있음을 보여주고, 이들 약제의 혼합인 二妙散은 이와 같은 작용에 대한 상승효과를 보여주고 있는 것으로 보아 관절염과 같은 염증질환을 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

관절 활막액에서 불포화지방산으로부터 생성되는 PGE₂는 염증의 유발 물질이며, 관절염의 유발 원인이기도 하다. 따라서 본 연구에서는 二妙散과 구성약물인 蒼朮과 黃栢이 PGE₂의 생성 억제효과와 이를 생성하는 유도성 효소인 COX-2의 발현 억제효과를 조사하였다.

대식세포인 RAW264.7 세포를 LPS로 활성화시키면 PGE₂의 생성이 증가하였고, 이러한 증가는 蒼朮과 黃栢을 처리에 의하여 감소하였다. 또한 二妙散을 처리하면 PGE₂의 생성 억제가 더욱 강하게 나타났다(Fig. 4A). PGE₂를 생성하는 유도성 효소인 COX-2의 발현은 LPS에 의하여 증가하였고 이러한 발현 증가는 蒼朮과 黃栢에 의하여 감

소하고 있음을 확인되었다. 더 나아가서 이 효소의 발현은 二妙散의 처리에 의하여 강하게 억제됨을 확인하였다(Fig. 4B).

이러한 결과는 蒼朮과 黃栢이 COX-2의 발현을 억제함으로 PGE₂의 생성을 억제할 수 있으며, 蒼朮과 黃栢을 혼합한 二妙散을 사용하면, 더욱 더 강한 염증 억제 효과를 나타낼 수 있음을 시사하고 있다.

관절염의 유발은 대식세포에 의해서만 유발되고 진행되는 것이 아니고, 다양한 세포가 관련된 복잡한 과정에 의하여 진행되고 있다.

Rheumatoid arthritis의 유발 및 진행과정에는 osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts 그리고 Th1/Th2 cells가 관여하고 있다. 따라서 본 연구에서는 rat osteoblast sarcoma cells인 ROS17/2.8에서 NO의 생성에 미치는 二妙散 및 구성약물인 蒼朮과 黃栢의 효과를 조사하였다.

ROS 17/2.8 세포를 CM(100 U/ml IL-1 β , 200 U/ml IFN- γ 그리고 500 U/ml TNF- α)으로 활성화 시키면 NO의 생성이 증가하였는데, 蒼朮과 黃栢을 처리하면 NO의 생성이 억제되었다. 또한 二妙散을 처리하면 ROS 17/2.8 세포로부터 생성되는 NO는 현저하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 5A). 한편 CM에 의한 iNOS의 발현이 蒼朮과 黃栢에 의하여 억제되었고, 二妙散은 매우 효과적으로 iNOS의 발현억제를 보여 주었다(Fig. 5B).

이러한 결과는 二妙散과 蒼朮과 黃栢이 rheumatoid arthritis의 유발과 진행의 원인이 되는 세포의 활성화를 억제하여 NO와 같은 염증 매개인자의 생성을 억제함으로 rheumatoid arthritis를 치료할 수 있음을 제시하고 있다.

CIA 모델에서 二妙散의 관절염 예방 효과를 연구하기 위해서 CII/CFA를 injection 후 15일부터 42일까지 二妙散 20 mg/kg을 DBA/1J mice의 복강에 하루에 1회 투여하고, 관절염의 평가는 첫 주사 후 16일부터 50일 까지 일주에 3회씩 incidence of arthritis를 측정 하였다. CII/CFA를 주사 한

후 30일부터 증상이 나타나기 시작해서 35일경이 되면 100%발병하는 것을 관찰되었고, 二妙散을 투여한 group의 paw에 나타나는 부종과 종창 정도의 위중도(arthritis index)는 collagen만 처리한 대조군에 비하여 약 50%정도가 감소되었다(Fig. 6A).

Fig. 6B는 arthritis의 정도를 보여 주는 사진으로 二妙散을 투여시 부종의 정도가 감소함을 보여 주고 있다. Ankylosis의 발생은 二妙散을 투여시 대조군에 비하여 70% 정도 감소되었다(Fig. 6C).

이러한 결과는 collagen 투여로 유발되는 관절염 모델에서 二妙散이 관절염의 진행을 억제할 수 있음을 제시하고 있다.

지금까지의 실험결과를 종합해 보면, rheumatoid arthritis를 유발할 수 있는 여러 가지 염증성 매개인자들에 대한 대식세포 및 조골세포의 실험을 통하여 二妙散이 그 構成藥物인 蒼朮, 黃柏보다 상승된 抗염증효과를 나타내었고 또한 CIA 모델동물에서도 二妙散의 anti-rheumatoid arthritis효과가 입증되고 있는 바 方劑 構成 理論인 君臣佐使法을 활용한다면 보다 효과적이고 부작용이 없으면서, 실용성이 높은 치료제 개발에 대한 많은 가능성을 제시하는 것으로 시사하는 바가 크다고 생각된다.

앞으로 이러한 효과에 대한 기전연구나 기존 치료제와의 비교실험 등 좀 더 깊은 연구가 필요하다고 본다.

V. 結 論

세포 배양조건과 동물실험에 二妙散및 蒼朮과 黃柏의 anti-rheumatoid arthritis효과를 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 二妙散및 蒼朮과 黃柏은 세포 배양 조건에서 대식세포와 osteoblasts에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하여 NO, cytokine(IL-1 β , IL-6 그

리고 TNF- α) 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제함을 보였다.

2. 二妙散은 蒼朮, 黃柏 각각보다 염증매개 인자의 생성을 강하게 억제할 수 있는 상승효과를 보였다.

3. 二妙散이 collagen-induced arthritis 동물 모델에서 ankylosis의 발생은 70%, 부종 및 종창의 정도를 50%정도 감소시킴을 확인 되었다.

이러한 결과는 二妙散이 관절염을 예방하거나 치료할 목적으로 이용할 수 있음을 시사하고 있다.

參考文獻

1. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京:人民衛生出版社. 2001:255.
2. 江克明. 包明蕙 編著. 簡明方劑辭典. 北京:上海科學技術出版社. 1989:11.
3. 周明新. 新增醫門寶鑑. 서울:東洋綜合通信教育院出版部. 1987:57.
4. 藏菴堂. 中醫臨床方劑學. 北京:人民軍醫出版社. 1995:212.
5. 金相贊외. 方劑學. 서울:永林社. 1999:500.
6. 李常仁. 天真處方解說. 서울:成輔社. 1978:329.
7. 吳岷著. 醫方考, 醫聖堂, 서울, 1993:69-70.
8. 廉太換. 東醫處方大典. 서울:행림출판사. 1972:326.
9. 龔廷賢. 萬病回春. 人民衛生出版社, 北京, 1984.
10. 宗全和. 中醫方劑通釋. 河北科學技術出版社, 北京, 1995:161.
11. 張錦濤 외. 實用中醫方劑學. 北京:樂羣出版社. 1876:273-4.
12. 許濟群 외. 方劑學. 北京:人民衛生出版社. 1995:495-6.
13. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 서울:法仁文化社. 1999:371, 376, 475, 497, 498, 501, 658, 715, 756, 779, 782, 787, 788, 836, 979, 980, 981, 1090, 1491, 1495,

- 1497.
14. 虞搏. 醫學正傳. 서울:成輔社. 1986:209, 215, 227.
 15. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울: 大星文化社. 1983: 114, 117, 217.
 16. 李撰. 安秉國譯. 偏註醫學入門. 서울:南山堂. 1974: 4권 517, 680, 335, 338, 716, 733, 5권 154, 6권 197, 237, 390.
 17. 周命新. 醫門寶鑑. 대구:동양종합통신교육원출판국. 1987:180, 283.
 18. 謝鳴. 中醫方劑現代研究. 北京:學苑出版社. 1997: 1397.
 19. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:永林出版社. 1988: 415, 312.
 20. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1981:306, 653, 654.
 21. 鄭虎占. 中藥現代研究與應用. 北京:學苑出版社. 1998:4051.
 22. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:504-5, 991.
 23. 安德均. 原色韓國本草圖鑑. 서울:教學社. 1998: 124, 366.
 24. 啓業書局有限公司. 抗癌中草學. 北京:浩原印刷. 1987:58.
 25. 김갑성 외. 실용동서의학임상총서. 서울:도서출판정담. 2001:400.
 26. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 1998: 137.
 27. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T, Yonezawa T, Saeki Y, Panayi G.S, Pitzalis C, and Kimura, T. Rheumatol. The role of TNF- α in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis(RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Mar;41(3):329-37.
 28. Chikanza I. and Fernandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000 Sep;1499-510
 29. Mazzetti I, Grigolo B, Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Roseti L, Meliconi R, and Facchini A. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)*. 2001 Dec;101(6):593-9.
 30. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, and Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1996 Feb;23(2):230-6.
 31. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989 Jun;38(11):1709-15.
 32. Hedbom E. and Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis:the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jan;59(1):45-53.
 33. Strestikova P, Otova B, Filipec M, Masek K, and Farghali H. Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression by FK 506 and cyclosporin A. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001 Feb;23(1):67-74.
 34. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, and Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):1402-11.
 35. Thornton S, Boivin GP, Kim KN, Finkelman FD, and Hirsch, R. Heterogeneous effects of IL-2 on collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2000 Aug;165(3):1557-63
 36. Palmblad K, Erlandsson-Harris H, Tracey KJ, and Andersson U. Dynamics of early synovial cytokine expression in rodent collagen-induced

- arthritis:a therapeutic study using a macrophage-deactivating compound. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):491-500.
37. Kang I, Lee WW, and Lee Y. Modulation of collagen-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone: the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA, *Immunopharmacology.* 2000 Sep;49(3):317-24.
38. Hughes C, Wolos JA, Giannini EH, and Hirsch R. Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol.* 1994 Oct;153(7):3319-25.