

우슬(牛膝)의 콜라겐 유도 관절염 생쥐에 대한 개선 효과

김창수¹, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

The therapeutic effect of *Achyranthis Radix* on the collagen-induced arthritis in mice

Chang-Soo Kim¹, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, 2 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The present study was undertaken to determine whether the water extract of *Achyranthis Radix*, which is the roots of *Achyranthes japonica* (*Achyranthis Radix*, AR), is efficacious against collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1J mice.

Methods : Mice were immunized with bovine type II collagen and orally treated with AR-W (50 and 100 mg/kg/bw) from days 21 to 42 after immunization. Arthritis was evaluated by arthritic score, histological examination of knee joint and serological markers such as TNF- α , PGE₂ and anti-type II collagen (CII)IgG.

Results : The results showed that comparing with untreated CIA mice, treated with AR-W significantly suppressed the clinical score and joint tissue pathological damages, reduced the serum levels of TNF- α , PGE₂ and anti-CII IgG in CIA-mice. These results suggest that AR-W can effectively alleviate inflammatory response on CIA, and anti-inflammatory of AR-W can be attributed, at least partially, to the inhibition of inflammatory mediators, PGE₂ and TNF- α , in CIA.

Conclusions : This study suggests that AR-W has a therapeutic potential in inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis.

Key words : *Achyranthes japonica*, *Achyranthis Radix*, anti-arthritis, collagen-induced arthritis, inflammation,

서론

류마티스 관절염은 관절 활액막(synovium)에 만성적으로 비대 및 염증반응이 일어나 연골과 골파괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 특징으로 하는 대표적인 자가면역질환이다¹⁾. 일반적으로 우리나라 인구의 1~2%가 류마티스 관절염 질환을 가지고 있으며, 주로 30~50대의 여성에게 호발하며, 발병율은 연령에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다^{2,3)}. 류마티스 관절염에 의한 관절 침범은 전신의 모든 관절에 적용되나, 특징적으로 손과 발의 관절, 특히 근위지관절과 중수(족)지 관절에서 비세균성 만성염증반응이 장기간 나타나면서 관절통이나 종창이 악화와 호전을 반복하며, 초기에는 활액막이 증식하고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하게 되며, 만성적인 경과를 밟게 되는데 치료를 하지 않을 경우 염증으로 인한 관절의 변형과 파괴로 관절 기능의 영구적 손실을 가져오기 때문에 신속한 진단과 적절한 치료가 필수적이다^{4,5)}.

한의학에서는 류마티스 관절염은 痺證의 범주의 속한다고 볼 수 있는데⁶⁾, 痺란 기혈운행이 不通하거나 근맥관절의 濡養이 失調되었을 때, 風寒濕熱의 邪氣에 感受하여 발생하며 肢體, 關節의 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障碍等を 主要症狀으로 하는 하나의 病證이다^{7,8)}.

우슬(牛膝, 本經, *Achyranthis Radix*)은 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 다년생 草本인 우슬(懷牛膝, *Achyranthes bidentata* Blume)과 麻牛膝(*Cyathula capitata* (Wall.) Miq.) 및 川牛膝(*C. officinalis* Kuan.)의 뿌리를 건조한 것으로 우리나라에서는 토우슬(*Achyranthes japonica*)의 뿌리를 주로 사용한다⁹⁾. 우슬에 대하여 東醫寶鑑¹⁰⁾에는 '성질은 平하며, 맛은 苦酸하고 무독하며, 寒濕의 痿痺와 膝痛으로 인하여 屈伸하지 못하는 것과 남자의 陰消와 노인의 遺尿를 다스리며, 骨髓를 메우고 陰氣를 利하게 하며 머리털이 희는 것과 陰痿가 일어나는 것을 막고, 腰脊痛을 치료하고, 墮胎시키고, 월경을 통하게 한다고 되어 있다.' 즉

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학.

· Tel : 054-770-2661, · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.

· 접수 : 2010년 11월 5일 · 수정 : 2010년 12월 7일 · 채택 : 2010년 12월 15일

우슬은 성미가 평(平)하며, 맛은 쓴맛과 신맛을 가지고, 신장과 간장의 경락에 작용하며, 어혈을 제거하며 십이경맥을 도우며 혈액순환을 촉진하고, 혈액을 생성하는 효능과 인체의 상부로 오르는 열을 떨어뜨리는 효능이 있으며 다른 약을 허리나 다리 쪽으로 이끄는 효능이 있다¹¹⁻¹³.

우슬에 대한 실험연구로는 우슬 물추출물 약침의 LPS 유도 염증성 관절염 생쥐에서의 세포성 면역반응 억제효과^{14,15}, 독성자유키 소거에 의한 산화억제효과¹⁶, 항균효과¹⁷, Carrageenan으로 유발한 관절염 흰쥐에서의 항염증효과¹⁸, 파골세포 분화와 골흡수 억제효과^{19,20}, 혈행개선효과²¹가 보고되었다. 그러나 우슬의 관절염에서의 예방 및 개선 효과에 대한 연구는 없다.

이에 저자는 우슬의 관절염에 미치는 효능을 실험적으로 증명하고자, 우슬의 물추출물을 제조하여 콜라겐 유입에 의해 관절염이 유발된 생쥐(collagen-induced arthritis; CIA mice)에 투여하여 류마티스 관절염과 관련된 여러 병리학적 변화를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 우슬(토우슬: *Achyranthes japonica*의 뿌리, *Achyranthis Radix*; AR)은 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하였으며, 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 7~8주령의 DBA/1J계 수컷 생쥐(mouse, 20~25 g)를 (주)오리엔트바이오(경기도, 한국)으로부터 구입하였다. 모든 실험동물은 고품사료와 물을 제한 없이 공급하였으며, 일정한 온도($23 \pm 3^\circ\text{C}$)와 습도($50 \pm 10\%$) 및 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하여 사육하였다. 생쥐의 관리, 사용 및 취급은 미국 NIH 기준과 대한의학회 제정 동물실험지침(2000년)에 준하여 시행하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약은 collagen(type II, Sigma-Aldrich, St Louse, CA, USA), Complete Freund's adjuvant(Sigma-Aldrich), H&E stain kit(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), Collagen Type II Antibody ELISA kit(MD Bioproduct, Division of MD Biosciences Inc., St Paul, MN, USA), PGE₂ EIA kit(Cayman, MA, USA), DuoSet mTNF- α ELISA Development System(R&D System, Inc., MN, USA) 등을 사용하였다.

실험에 사용되어진 기기로는 Microplate Reader(Asys, Sunnyvale, CA, USA), Rotary Evaporator(Eyela, Japan), Orbital Shaker(Finemould Precision IN, Co., Gyenggi-do, Korea), Microscopy(Olympus Imaging America Inc., Center Valley, PA 18034-0610, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 우슬 물추출물의 제조

우슬(AR) 200 g을 세말하여 증류수 2L와 함께 heating mantle에 넣고 3시간 동안 열추출한 후 3겹 거즈와 와트만여과지(Wathman No. 1)로 여과하였다. 그 여과액을 진공회전증발농축기(rotary vacuum evaporator)에서 감압 농축한 다음 동결 건조하였다. 우슬 물추출물의 총 회수량은 21.2 g이었으며, 냉장 보관하면서 실험 전에 멸균된 생리식염수에 완전히 용해한 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 사용하였다.

2) 콜라겐 유도 관절염 동물 제작

콜라겐에 의한 관절염 유발(collagen-induced arthritis; CIA)은 먼저 0.01 N acetic acid에 제2형 콜라겐(bovine type II collagen) 2 mg/ml을 4°C에서 하룻밤 녹인 후 동량(w/v)의 Freund's complete adjuvant(Chondrex, SA, USA)와 잘 혼합하여 0.1ml을 생쥐의 둔부(꼬리가 몸체로 이어지는 부위)에 피하주사(intradermal)하였다. 또한 14일 후 동일 방법으로 제조된 콜라겐 용액에 Freund's incomplete adjuvant를 동량으로 혼합하여 생쥐의 뒷다리 족근골에 피하주사함으로써 관절염을 유발하였다(Fig. 1).

실험군은 생쥐(DBA1/J) 10마리를 한 군으로 하여 관절염을 유발시키지 않은 정상 대조군(normal control), 관절염을 유발시킨 대조군(CIA control) 및 우슬 물추출물을 투여한 약물군(CIA+AR-EE) 및 대조약물로 비선택적 COX-2 억제제이며 항염증제인 indomethacin을 투여한 약물 대조군(CIA+Indomethacin)으로 나누었다.

약물의 투여는 우슬 물추출물 50, 100 mg/kg/bw 또는 indomethacin 1 mg/kg/bw를 CIA를 유발한 후 28일부터 48일까지 4주 동안 매일 1회, 정해진 시간에 경구 투여하였으며, 49일에 모든 실험동물을 희생시켜 관절염 개선 정도를 평가하였다.

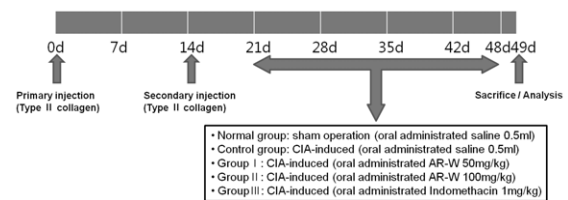


Fig. 1. Experimental scheme in collagen-induced arthritis mouse model

3) 관절염 평가

발 관절염은 28일부터 48일까지 매주 한번 관찰하였으며, 관절염 정도(clinical severity)를 William 등²²에 의한 관절염 육안평가방법(rheumatoid scoring system)을 이용하여 평가하였다. 즉, 부종이나 발적, 종창 등 관절염의 증거가 없는 경우 0 (normal), 한 두 개의 발가락 종창을 동반한 홍조를 띄거나 최소한의 종창이 유발된 상태로 족근골이나 발목 관절에 국한된 경한 부종과 발적이 있는 경우 1점(slight swelling and/or erythema of the fingers), 확실한 홍조를 띄거나 국부적 상지 종창, 그리고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태, 발목 관절에서 족근골에 걸친 중증도의 부종과 발적이 있는 경우 2점(pronounced edematous swelling), 무

를까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되고 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 발목에서 발가락 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우 3점(joint rigidity with edematous swelling or joint ankylosis)으로 하여 점수를 측정하였다. 1점과 2점은 주로 가역성(reversible)의 부종성 염증(edematous inflammation)을 동반하며, 3점은 비가역성(irreversible)의 이미 관절염이 진행된 관절 강직(joint ankylosis)를 나타낸다. 관절염의 평가는 실험군과 대조군에 대해 알고 있지 않은 두 명의 관찰자가 참여하여 관찰자에 따른 오차를 최소화하였다.

4) 혈액수집과 혈청 분리

실험 49일째 모든 실험동물을 에테르로 마취시킨 후 심장 천자에서 혈액을 수집하였으며, 6,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70°C 에 보관하면서 차후 혈액학적 검사를 위해 사용하였다.

5) 혈액학적 검사

(1) 항콜라겐 항체 측정

혈청 내 항콜라겐 항체의 함량은 ELISA 방법으로 anti-C II IgG ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 96 well polystyrene microplate(Nunc, Denmark)의 각 well에 0.1M PBS에 녹인 chicken type II collagen($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$)을 가하여 4°C 에서 16시간 동안 반응시킨 후 0.05% Tween-20이 포함된 $1\times$ PBS(PBS-T)로 4회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 각 well에 0.5% ovalbumin이 포함된 $1\times$ PBS를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-T로 4회 세척하였다. 생쥐의 혈청은 $1\times$ PBS로 희석(1:100)하여 각 well에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 그 후 각 well에 peroxidase-conjugated antimouse IgG를 넣어 2시간 동안 반응시킨 후 5-aminosalicylic acid를 넣어 반응을 종료시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항collagen 항체 측정치는 3회 시행하여 평균값을 얻었으며, 여기에서 얻은 흡광도를 anti-C II IgG의 표준농도곡선에 대입하여 혈청 내 농도를 계산하였다.

(2) PGE₂ 측정

혈청 내 PGE₂의 양은 enzyme immunoassay(EIA)을 이용하여 측정하였다. 즉, PGE₂ EIA kit의 96-well plate에 표준액 및 검액을 분주한 후 PGE₂ AChE Tracer와 PGE₂ monoclonal antibody 용액을 분주하여 4°C 에서 24시간 반응시켰다. 이를 Ellman's reagent 용액으로 발색시킨 후 microplate reader의 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 여러 농도의 PGE₂ 표준액(1,000, 500, 250, 125, 62, 31, 16, 8 pg/ml)의 흡광도를 함께 측정하고, 4-parameter logistic 방정식인 $Y(\text{흡광도}) = \frac{A-D}{1+(검액의\ 농도(x)/C)^B} + D$ 를 이용하여 혈청 내 PGE₂의 농도를 계산하였다.

(3) TNF- α 측정

혈청 내 TNF- α 의 양은 ELISA 방법으로 TNF- α ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 mouse TNF- α 항체가 도포된 96-well polystyrene microplate의 각 well에 표

준 농도의 mouse TNF- α 를 넣고 동시에 생쥐의 혈청을 넣었다. 이 plate를 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 여기에 HRP-conjugated anti-mouse TNF- α 를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. 여기에 다시 substrate chromogen solution을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1 M H₂SO₄를 넣어 반응을 중지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF- α 의 측정은 3회 시행하여 평균값을 얻었으며, 여기에서 얻은 흡광도를 통해 TNF- α 의 표준농도곡선에 대입하여 혈청 내 TNF- α 의 농도를 계산하였다.

6) 조직표본 제작 및 염색

실험 49일째 모든 실험동물을 희생시킨 후 우측 족근관절이 포함되도록 경골 원위부에서 중족골(metatarsal) 원위부(distal) 사이를 적출하고 10% 중성 포르말린용액(formaldehyde)에 4°C 에서 24시간 고정한 후 20% formic acid에 3일간 침지하여 탈회하였다. 탈회된 조직을 24시간 수세하여 조직 내 남아있는 포르말린을 제거한 후, 50% 알코올에서부터 무수알코올까지 농도 상승순으로 탈수하고 자일렌(xylene)으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 파라핀 블록을 제작하였으며 회전형 박절기(microtome)를 사용하여 5 μm 두께로 자른 뒤 슬라이드 위에 놓아 조직표본을 제작하였다.

제작한 파라핀 조직표본은 xylene, 무수알코올, 50% 알코올 순으로 탈 파라핀 과정을 거친 후 Hematoxylin & eosin(H&E) 염색시약으로 염색하여 광학현미경 하에 관절조직의 형태변화를 관찰하였다.

7) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램의 one-way ANOVA, Tukey's test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 관절염 발병도 변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 나타나는 관절염의 발병도(clinical severity)에 대한 우슬 물추출물의 효과를 확인하기 위해 콜라겐 주입 후 28일부터 48일까지 매주 1회 관절염 지수(arthritis score)를 평가하였다.

그 결과, CIA 대조군에서는 실험 28일부터 48일까지 관절염의 지수가 시간에 의존적으로 증가하였으나, 우슬 물추출물(AR-W)을 50, 100 mg/kg 농도로 경구 투여한 약물군은 CIA 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다(Fig. 2). 또한 양성대조약물인 Indomethacin 투여군에서도 우슬 물추출물 100 mg/kg 투여군과 유사하게 CIA 대조군에 비해 유의적으로 관절염 지수가 감소되었다.

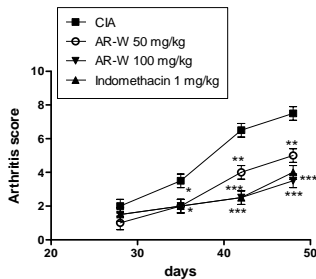


Fig. 2. Effects of Achyranthis Radix water extract on progression of established CIA in DBA/1J mice. Mice were treated with Achyranthis Radix water extract(AR-W) or indomethacin once daily from 21 to 42 days after immunization. Results are expressed mean± SD (n=10). * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. CIA group.

2. 항콜라겐 항체에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 나타나는 콜라겐 항원에 대한 특이적 항체인 항collagen 항체에 대한 우슬 물추출물의 효과를 조사하기 위해서 ELISA 방법으로 혈청 내 anti-CII IgG의 양을 측정하였다.

그 결과, 정상대조군에서는 142.6 ± 0.94 mU, CIA 대조군에서는 714.7 ± 44.09 mU, 우슬 물추출물(AR-W)을 50과 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각 605.4 ± 20.83 mU, 436.7 ± 8.54 mU로 우슬 물추출물 투여군은 대조군에 비하여 모두 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 또한 indomethacin을 투여한 군에서도 457.4 ± 34.4 mU로 대조군에 비하여 역시 유의적인 감소를 나타내었다.

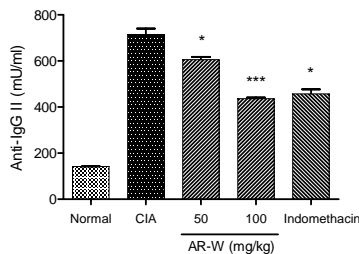


Fig. 3. Effects of Achyranthis Radix water extract on anti-type II collagen IgG in sera of mice. Mice were treated with Achyranthis Radix water extract(AR-W) or indomethacin once daily from 21 to 42 days after immunization. Results are expressed mean± SD (n=10). * p <0.05 and *** p <0.001 vs. CIA group.

3. PGE₂에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 다량 생성되는 염증물질인 PGE₂에 대한 우슬 물추출물의 효과를 조사하기 위해서 효소면역반응법으로 혈청 내 PGE₂의 양을 측정하였다.

그 결과, 정상대조군에서는 103.5 ± 11.58 pg/ml, CIA 대조군에서는 800.7 ± 53.09 pg/ml, 우슬 물추출물(AR-W)을 50과 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각 643.2 ± 99.51 pg/ml, 268.1 ± 27.61 pg/ml로 우슬 물추출물 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 PGE₂가 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 또한 indomethacin을 투여한 군에서도 368 ± 58.44 pg/ml로 대조군에 비하여 역시 유의적인 감소를 나타내었다.

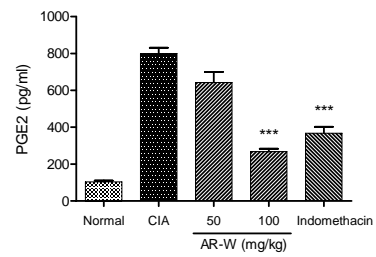


Fig. 4. Effects of Achyranthis Radix water extract on PGE₂ in sera of DBA/1J mice. Mice were treated with Achyranthis Radix water extract (AR-W) or indomethacin once daily from 21 to 42 days after immunization. Results are expressed mean± SD (n=10). *** p <0.001 vs. CIA group.

4. TNF- α 에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 관절염이 유발된 동물에서 다량 생성되는 염증사이토카인인 TNF- α 에 대한 우슬 물추출물의 효과를 조사하기 위해서 ELISA 방법으로 혈청 내 TNF- α 의 양을 측정하였다.

그 결과, 정상대조군에서는 42.51 ± 0.78 ng/ml, CIA 대조군에서는 78.72 ± 9.62 ng/ml, 우슬 물추출물(AR-W)을 50과 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각 38.41 ± 10.9 ng/ml, 33.63 ± 9.24 ng/ml로 우슬 추출물 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 TNF- α 가 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). 또한 indomethacin을 투여한 군에서도 35.96 ± 5.83 ng/ml로 대조군에 비하여 역시 유의적인 감소를 나타내었다.

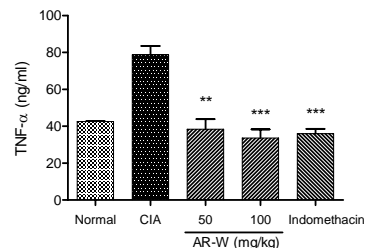


Fig. 5. Effects of Achyranthis Radix water extract on TNF- α in sera of DBA/1J mice. Mice were treated with Achyranthis Radix water extract (AR-W) or indomethacin once daily from 21 to 42 days after immunization. Results are expressed mean± SD (n=10). *** p <0.001 vs. CIA group.

5. 관절조직의 구조변화에 대한 효과

콜라겐 주입에 의해 류마티스 관절염이 유발된 생쥐에서 나타나는 족근관절의 손상에 대한 우슬 물추출물의 효과를 조사하기 위해서 실험 49일째 모든 동물을 희생시킨 후 우측 족근관절이 포함되도록 경골 원위부에서 중족골 원위부 사이를 적출하여 파라핀 조직표본을 제작하였다.

먼저, 생쥐의 족근관절을 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 구조적 변화를 관찰한 결과, 대조군(CIA)에서는 특이적으로 관절 주위의 부종과 다형 백혈구, 림프구 등의 침윤이 현저하게 관찰되었으며 활막의 염증(synovial inflammation), 비후와 더불어 현저한 관절면의 연골손실(bone erosion)을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이에 반하여 우슬 물추출물(AR-W)을 50, 100 mg/kg 투여한 군에서는 대조군에 비해서 모두 염증세포의 침윤과 활막의 비후가 억제되었으며 관절면의 연골손실이 줄어들었고 골 파괴도 개선된 것이 관찰되었다.

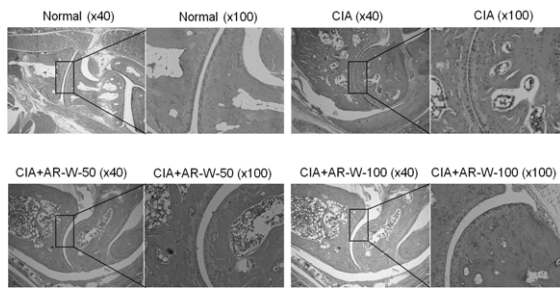


Fig. 6. Effects of *Achyranthis Radix* water extract on histological features of representative ankle joint from DBA/1J mice by H&E staining. Mice were treated with *Achyranthis Radix* ethanol water (AR-W) or indomethacin once daily from 21 to 42 days after immunization.

고찰

류마티스 관절염은 염증이 주로 골, 연골, 활막 조직의 근접 부위에서 발생하여 주위로 전이되는 형태를 보이며, 과도한 활막 염증조직의 비후는 판누스를 형성하게 되어 염증조직이 활성화됨으로써 주변 골 조직에 침윤되고 활액까지 파급됨으로써 관절조직 손상, 인대 파괴, 인접 근육 손상 등 심각한 기능 이상을 유발하게 된다^{2,3}. 최근 10여년동안 분자생물학, 생화학, 미생물학 및 면역학의 발달로 류마티스 관절염에 대한 개념에 많은 변화가 있었으며, 유발물질들의 발견으로 인한 분자면역학적인 병인규명과 새로운 면역조절 물질의 발견으로 인한 면역치료법의 연구로 인해, 최근 류마티스 관절염에 대한 면역학적인 측면에서의 접근이 주로 시도되고 있다²³. 류마티스 관절염은 완치시키거나 예방할 수 있는 방법은 없으며, 조기 진단을 통해 적절한 치료를 함으로써 비가역적 손상을 막아야 하는데 주로 활막의 염증으로 인한 관절의 변형과 파괴로 관절 기능의 영구적인 손실을 막고 장기 손상을 예방하기 위한 약물요법을 사용하고 있다. 즉 발병 초기에 선택적 COX-2 길항제, salicylate, NSAID 등과 같은 비스테로이드성 소염진통제를 사용하며 골미란(bone loss) 동반 시 triamcinolone, prednisone과 같은 부신피질호르몬제제의 사용한다. 또한 적극적으로 methotrexate, sulfasalazine, auranofin 등과 같은 항류마티스제제(DMARDs)를 투여하게 되며, 증상 및 질병 활성도가 조절되지 않으면 TNF- α 길항제, IL-1, IL-6 수용체 길항제 등의 생물학적 제제를 사용하거나 병용하게 된다²⁴⁻²⁶. 최근 병인에 대한 분자생물학적 이해가 깊어지면서 새로운 약물과 치료법이 등장하고 있지만 복용을 끊으면 다시 활성화되거나 실제 임상에서 효과가 미비하거나 지속력이 떨어지는 등 문제가 있어 아직 치료제 개발이 미비한 실정이다.

한의학에서는 류마티스 관절염을 주로 痺症과 關節風으로 표현하며, 痺는 저리며 순환이 안 된다는 의미이고, 關節風은 관절이 붓고 마디마디에 심한 통증을 나타낸다는 의미로 순환 장애로 인해 관절에 통증을 나타내는 질환으로 단순한 관절의 염증이 아니라 전신 질환으로 보고 있다. 또한 黃帝內經에서 痺症의 의미는 기본적으로 閉塞不通이며, 廣義로는 臟腑, 器官, 組織의 氣機가 적체되어 발생하는 증상이고, 狹義로는 風寒濕 三氣가 침범하여 氣血의 운행을 방해하고 經路의 흐름을 막아서 肢體에 통증이 발생하면서 마비가 오고 부어오르며 關節의 활동이 불편한 症狀을 의미한다^{7,8,27}.

즉, 류마티스 관절염은 그 원인은 정기가 부족하거나 기혈이 허약하여 우리 몸에 저항력이 떨어진 상태에서 오랫동안 냉하고 습한 곳에서 기거하거나 땀을 많이 흘린 후에 찬바람을 쐬면 풍한습의 나쁜 기운이 외부로부터 침범하여 발병하게 되며, 또한 체질적으로 오장육부 중 어느 장기의 기능이 허하거나 병을 오랫동안 방치하여 나쁜 기운이 장부에 이러러 각종 병리적 변화를 일으켜 발병하게 된다. 또한 정신적으로도 마음을 애태워 깊이 생각하는 일이 많고 슬프고 화나고 혹은 즐거운 기분을 억제하지 못하거나 음주 등 불규칙한 식생활이 원인이 될수 있다. 따라서 외감, 내상 및 체질적인 장부의 기능허약 등이 전신의 기혈순환에 장애를 유발하며 또한 이러한 순환장애로 인해 발생한 어혈이 역절풍의 원인이 된다고 하였다.^{7,8}

우슬은 국내에서는 쇠무릅(*Achyranthes japonica*)을 사용하고 중국에서는 懷牛膝(*Achyranthes bidentatae* Blume)과 川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)을 사용한다. 우슬은 한의학에서 관절염 치료에 대표적인 약재로 사용하며 強筋骨하는 작용이 있다고 보고 있다. 우슬에 대한 실험연구로는 LPS 유도 염증성 관절염 생쥐에서 우슬 약침의 세포성 면역반응 억제효과^{14,15}, 산화억제효과¹⁶, 항균효과¹⁷, Carrageenan으로 유발한 관절염 흰쥐에서의 항염증효과¹⁸, 파골세포 분화와 골흡수 억제효과^{19,20}, 혈행개선효과²¹가 보고되었다. 본 연구에서는 우슬 물추출물의 콜라겐 유입으로 류마티스 관절염 생쥐(collagen-induced arthritis; CIA mouse model)에서의 관절 활막 내 염증반응 억제 및 관절조직 보호효과를 확인하였다.

콜라겐 유도 관절염(collagen-induced arthritis, CIA)은 류마티스 관절염 모델 중 가장 널리 쓰이는 대표적인 자가 면역성 관절염 모델이며 제2형 콜라겐(type II collagen)을 주입함으로써 자가면역성이 유도되며 관절염 연구에 널리 이용되고 있다²⁸. 본 연구에서도 우슬 물추출물의 항류마티스 관절염 효과를 확인하기 위해 CIA 생쥐 모델을 제작하였다.

류마티스 관절염의 활막에는 항체를 만드는 B 세포와 형질 세포들이 많이 존재하며 콜라겐을 항원으로 주입한 생쥐는 병리적 역할을 하는 자가항체인 항콜라겐 항체를 생산하게 되며 이러한 항체는 관절 연골의 주요 구성요소인 콜라겐을 지속적으로 공격함으로써 파괴하게 된다²⁹. 본 연구에서 우슬 물추출물의 투여는 CIA 생쥐의 혈청 내 항콜라겐 항체의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 우슬이 류마티스 관절염 발달 시 자가항체 생산 반응을 조절함으로써 질환의 발달을 막을 수 있음을 의미한다.

류마티스 관절염에 의한 관절 침범은 전신의 모든 관절에 모두 적용되나 특징적으로 손과 발의 관절, 특히 근위지간 관절과 중수(족)지 관절을 침범하여 관절의 종창과 통증을 일으키며, 활막의 염증에 기인하기 때문에 활막염은 가장 중심적인 병리소견이 된다. COX-2에 의해 합성되는 prostaglandin으로 PGE₂와 PGI₂가 있으며, PGE₂는 결합하는 수용체에 따라 혈관확장(EP₂, EP₄), 혈관축소(EP₁, EP₃) 작용이 있고 발열(EP₃)에도 중요한 작용을 하며 골 흡수를 촉진하는 작용이 강하여 골다공증을 유발하는 주요인자로도 알려져 있다³⁰. 본 연구에서 우슬 물추출물은 CIA 생쥐의 혈청 내 PGE₂의 농도를 유의적으로 감소시켰으며, 이는 우슬이 류마티스 관절염 발달 시 관절 활막 내 PGE₂의 생성을 억제함

으로써 염증발달을 막을 수 있음을 의미한다.

류마티스 관절염은 병이 진행됨에 따라 염증이 심해져서 연부조직의 종창, 관절 주위 골밀도의 감소, 관절강 협착, 골미란, 관절경화 등의 증상을 나타내게 된다^{31,32}. 우슬은 파골세포 분화와 골흡수를 억제하고 골손실(bone loss)을 막음으로써 골다공증에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며¹⁸⁻²⁰, 본 연구에서 우슬은 콜라겐 유도 관절염 생쥐에서 족근 관절 주위의 부종과 다형 백혈구, 림프구 등의 침윤을 막고 활막의 염증과 비후를 억제하였고, 관절면의 연골손실을 줄임으로써 연골보호를 통해 관절염 개선효과를 나타내었다. 한편 류마티스 관절염은 염증 뿐 아니라 골 파괴를 특징으로 하는 질환으로 골 파괴로 인한 관절의 변형이 환자들에게 불편함을 주기 때문에 중요한 치료 목표 중 하나가 뼈를 보호하여 관절의 기능을 유지하게 하는 것인데, 일반적으로 H&E 염색은 관절 연골 세포의 형태학적 변화를 볼 수 있었다.

류마티스 관절염에서의 자가 면역반응은 Th1 면역세포에 의해 조절되는데 관절 활막염 조직에 침윤되는 T 세포는 CD4⁺ Th1 세포이며 주로 IFN- γ 와 같은 Th1 type 사이토카인을 분비하기 때문에 Th1 세포가 자가 면역반응을 조정하고 있을 것으로 보고 있다³³. Th1 세포들은 단핵구·대식세포, 활막세포를 활성화시킴으로써 이들로부터 IL-1, IL-6, TNF- α 와 같은 염증사이토카인의 분비를 촉진하게 되며, B 세포를 자극하여 류마티스 인자(rheumatoid factor), 항콜라겐 항체와 같은 자가항체의 생산을 유도하며, 파골세포의 분화를 유도하여 국소적인 골 파괴를 촉진하기도 한다^{34,35}. 본 연구에서 우슬 물추출물은 CIA 생쥐의 혈청에서 TNF- α 의 생성을 유의적으로 감소시켰다. 이는 우슬이 류마티스 관절염의 염증 발생에 기여하는 주요 사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제함으로써 활막염의 발생을 막을 수 있음을 의미한다. TNF- α 는 관절활막세포로부터 분비되는 염증사이토카인으로서 다양한 실험을 통해 관절염 환자의 관절 활막조직에서 TNF- α 의 유전자와 단백질 발현이 보고되고 있어 류마티스 관절염 병인기전에 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 인식되고 있으며, 최근 류마티스 관절염 치료를 위한 생물학적 제제로 TNF- α 길항제가 다양하게 개발되고 있고 현재 가장 많이 상용되고 있다^{26,36}. 최근 회우슬(*Achyranthes bidentata*)과 삼주(*Atractylodes japonica*)의 혼합추출물이 콜라겐유도 관절염, 지모산(zymosan) 유도 염증반응, carrageenan 유도 부종(edema) 및 acetic acid 유도 통증(writhing)을 억제함으로써 항관절염 및 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다³⁷.

결론적으로 본 연구를 통해 토우슬(*Achyranthes Japonica*)은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 생쥐에서 관절의 파괴와 손상을 줄이고, 활막염을 유발하는 염증물질들의 분비를 억제함으로써 류마티스 관절염을 효과적으로 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다. 우슬은 임상에서 각 종 골 질환에 우수한 효과를 보이는 약재로 널리 쓰이고 있으며 본 연구를 통해 우슬 물추출물이 류마티스 관절염을 유발하는 관절활막세포에서 염증반응을 효과적으로 억제함으로써 염증성 골 파괴를 막고 관절 조직을 보호할 수 있음을 알 수 있었다. 이 결과를 통해 최근 가속화되고 있는 고령화 사회 속에서 우슬이 류마티스 관절염을 비롯하여 각 종 관절질환의 예방 및 치료제 개발에 중요한 후보 약물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 우슬(*Achyranthes japonica*)의 콜라겐 유도 관절염 생쥐(mouse)에 대한 개선효과를 확인하였다.

1. 우슬 물추출물은 콜라겐 유도 관절염 생쥐에서 관절염 지수를 시간에 의존하여 유의적으로 감소시켰다.
2. 우슬 물추출물은 콜라겐 유도 관절염 생쥐의 혈청 내 항콜라겐 항체, PGE₂, TNF- α 의 생성과 분비를 유의적으로 감소시켰다.
3. 우슬 물추출물은 콜라겐 유도 관절염 생쥐의 관절조직에서 관절염으로 인한 염증세포 침윤과 활막의 비후를 감소시켰다.

따라서 우슬은 콜라겐 유도 관절염 생쥐에서 자가항체와 염증물질의 생성을 억제함으로써 항관절염 효능이 인정되었으며, 이는 우슬이 사람의 관절염 질환 개선을 위한 약물로도 활용할 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 동국대학교 연구비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. In: Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, eds. Harrison's principles of internal medicine, 16th ed. New York:Mc Graw Hill, 2005: 1968-77.
2. Song YW. Updated pathophysiology of rheumatoid arthritis. Kor J Medicine. 2009; 76: 1-6.
3. Park SH. New diagnostic method of rheumatoid arthritis. Kor J Medicine. 2009; 76: 7-11.
4. 대한정형외과학회. 정형외과학. 5판. 서울:최신의학사. 2000: 109-31, 157-74, 176.
5. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1997: 85, 1166-70, 1672.
6. 전국한의학대학재활의학교실. 동의재활의학과학. 서울:서원당. 1995: 95-6
7. 上海中醫學院編. 內科學(上). 上海:上海科學技術出版社. 1983; 234-38.
8. 鄭錫熙. 痺症의 分類와 治療에 關한 考察. 韓方物理療法學會誌. 1991; 2: 56-66.
9. 전국한의학대학 공동교재편찬위원회 편저. 본초학. 서울:영림사. 2007: 466-7.
10. 허준. 국역동의보감. 서울, 남산당, 1981: 1180.
11. Ma A, Guo H. Effect of radix *Achyranthes bidentatae* on memory and endurance. Zhong Yao Cai. 1998; 21: 624-6.

12. Yang Z, Zhang B, Cai L. Study on processing conditions of wine baked radix *Achyranthis bidentatae*. *Zhong Yao Cai*. 2000; 23: 681-2.
13. Wang T, Cui SY, Suo YR, Lu RH. Studies on water-soluble chemical constituents in root of *Achyranthes bidentata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2004; 29: 649-52.
14. Lee SD, Kim KS. The effect of *Achyranthis Radix* and Apitoxin Aqua-acupuncture on cellular immune responses to LPS-induced arthritis in mice. *J Kor Acupuncture & Moxibustion Society*. 1999; 16: 287-315.
15. Do WS, Kim KH, Kim KS. Effect of aqua-acupuncture(Cortex Ulmi Pumilae, Ramulus Cinnamomum, Radix achyranthis, Apitoxin · Calculus Bovis · Fel Ursi · Moschus compound) in mice with lipopolysaccharide induced arthritis. *J Kor Acupuncture & Moxibustion Society*. 2001; 18: 157-69.
16. Li XP. Experimental study on anti-senility of the 4 famous Chinese herbs produced in Huaqing area. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1991; 11: 486-7.
17. Jung SM, Choi SI, Park SM, Heo TR. Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile*. *Kor J Food Sci Technol*. 2007; 39: 564-8.
18. Kim YO, Lee SW, Lee SE. Effects of *Achyranthes japonica* on carrageenan-induced arthritis rat model. *Kor J Medicinal Crop*. 2009; 17: 470-4.
19. Kim JH, Ki JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of *Achyranthis Bidentatae Radix* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Kor J Herbology*. 2010; 25: 65-74.
20. Hu SM, Zhou P, Fu Q, Yang JJ, Gao XM. Effect of a Chinese herbal prescription on collagen I in rat's femur under simulated weightlessness. *Zhongguo Gu Shang*. 2010; 23: 117-9.
21. Xie F, Li X, Sun K, Chu Y, Cao H, Chen N, Wang W, Liu M, Liu W, Mao D. An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage. *J Tradit Chin Med*. 2001; 21: 225-31.
22. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *USA:Proc Natl*. 1992; 89: 9784-8.
23. 김영태, 이제동, 이윤호, 최근. RA와 관련된 임상 및 실험논문의 경향. *대한침구학회지*. 2001; 19: 190-4.
24. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1989; 41: 1552-63.
25. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgeo E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Gagerty DT, Moreland LW. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1907-15.
26. Seo YI. New drugs for rheumatoid arthritis. *Kor J Medicine*. 2009; 76: 12-7.
27. JD Lee. Korean Medicine approach to rheumatoid arthritis. *J Kyung Hee Univ Med Cent*. 2004; 20: 4-9.
28. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977; 146: 857-68.
29. Lee J. B cells and autoantibody in RA pathogenesis. *Hanyang Medical eviews*. 2005; 25: 21-5.
30. Akaogi J, Nozaki T, Satoh M, Yamada H. Role of PGE₂ and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006; 6: 383-94.
31. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 328-46.
32. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2591-602.
33. Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. Molecular targets of rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008; 7: 53-66.
34. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity*. 2008; 28: 440-4.
35. Ji JD. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Hanyang Medical reviews*. 2005; 25: 43-52.
36. Cole P, Rabasseda X. The soluble tumor necrosis factor receptor etanercept: a new strategy for the treatment of autoimmune rheumatic disease. *Drugs Today (Barc)*. 2004; 40: 281-324.
37. Han SB, Lee CW, Yoon YD, Lee JH, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Lee K, Park SK, Kim HM. Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from *Achyranthes bidentata* and *Atractylodes japonica*. *Arch Pharm Res*. 2005; 28: 902-8.