

루푸스 동물 모델에서 人蔘附子湯이 미치는 영향

김경신¹ · 문성식¹ · 김병수¹ · 강정수^{1*}

Study of Insam-Buja-Tang (IBT) on MRL/MpJ-Faslpr lupus-prone mice

Kim Kyoung-Shin¹ · Moon Sung-Sikm¹ · Kim Byoung-Soo¹ · Kang Jung-Soo^{1*}

¹Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Systemic Lupus Erythematosus(SLE) is an autoimmune disease invading the skin, joint, kidney, intestinal membrane, neurosystem and other organs. SLE is an autoimmune disease characterized by immune dysregulation resulting in the production of antinuclear antibodies(ANA), generation of circulating immune complexes, and activation of the complement system.

In Korean medicine, lupus can be classified as acute arthritis, reddish butterfly erythema, asthenic disease, edema and so on. The cause and procedure of the diseases are flourishing noxious heat, excessive fire due to deficiency of yin, blood stasis due to stagnation of qi, internal movement of the liver-wind, congenital deficiency, exhausted vital-qi, which are treated by clearing away heat and cooling the blood, nourishing yin and extinguishing fire, treating flatulence and activating blood circulation, nourishing the blood to expel wind, invigorating the liver and kidney, invigorating qi and replenishing the blood.

To experimentally examine the influence of Insam-Buja-Tang (Ginseng & Aconiti Extract, IBT) on the outbreak and development of lupus, lupus induce MRL/MpJ-Faslpr lupus-prone mice model was used. As IBT was orally administrated to a lupus model mouse, various tests such as the weight, urine protein, renal function, Lymph cell test of the spleen, Cytokine expression, histopathological analysis of kidney were performed to see the influence on the kidney and whether it work effectively on the immune function.

The main purpose of this study is to evaluate the effect of IBT on MRL/MpJ-Faslpr lupus-prone mice model. The effect of IBT on MRL/MpJ-Faslpr lupus-prone mice that can have autoimmune disease similar to SLE in human was evaluated after IBT per oral in the present study.

Key words : systemic lupus erythematosus(SLE), Insam-Buja-Tang(IBT), MRL/MpJ-Faslpr lupus-prone mice

I. 서론

전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, 이하 SLE 또는 루푸스)는 자가

항체의 증가로 인하여 조성되는 면역 복합체의 증가와 조직에의 축적에 의하여 발병하며¹⁾ 발열, 안면에 나비모양의 발진, 홍반, 관절염, 낭창성 신염, 경련발작 등의 중추신경계 증상, 심막염, 흉막염, 폐렴, 용혈성 빈혈, 백혈구 및 혈소판 감소 등의 증상이 나타나는 자가 면역 질환이다²⁻³⁾. 가장 심각한 증상은 신부전에 의하여 사망까지 이르게 하는 낭창성 신염으로, 이에 대한 임상 소

* 교신저자 : 강정수 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 생리학교실 E-mail : omdkjs@dju.kr
투고일 : 2011년7월12일 수정일 : 2011년7월25일
확정일 : 2011년8월1일

견은 광학전자현미경이나 면역형광현미경으로 관찰하면 거의 모든 발병에서 신침범 소견을 관찰할 수 있다고 알려져 있다. 루푸스는 최근 정밀한 검사법의 발달에 따라 진단되는 환자가 증가하는 추세이다⁴⁾. 루푸스는 직접적인 치료법이 없으며 대개의 경우 대증약물을 투여하거나 NSAIDs, 스테로이드를 투여하며, immunosuppression agent (azathioprine, chlorambucil, cyclophosphamide) 등을 적용한다⁵⁾. 이러한 약물들의 부작용으로 감염의 증가⁶⁾ 장기간 약물사용에 의한 약성 종양⁷⁾ 등이 유발될 수 있다. 루푸스는 다클론성 B세포의 활성으로 자가항체 및 면역복합체 생성이 증가하여 여러 장기에 손상을 입히고, 만성적인 경과를 보이는 자가면역질환이다⁸⁾. 자가반응성 B세포는 정상인에서도 존재하나, 그 수는 증식을 시키는 자극이 없으면 며칠 내에 세포가 죽음으로써 조절된다. 이러한 조절과정을 세포사멸(apoptosis or programmed cell death)이라고 하며 자가관용(self-tolerance) 확립에 중요하다⁹⁾. 최근에 세포사멸의 이상이 자가면역질환 특히, 루푸스의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다.

한의학에서는 全身性 紅斑性 狼瘡은 그 침범 부위가 다양해서 각각 해당하는 명칭이 매우 많다. 본 연구의 초점이 될 낭창성 신염은 『金匱要略』의 ‘腎着’에 해당하는 것으로 보고 있으며, 그 원인은 脾胃가 虧損하여 陰陽氣血이 부족하여 발생한 것으로 보고 있다¹⁰⁾. 이에 본 실험은 脾胃陽虛에 유효한 인삼부자 추출물 (Insam-Buja-Tang, IBT)를 사용하여¹⁰⁻¹¹⁾ SLE 질환의 모델로 사용되는 MRL/MpJ-Faslpr 마우스를 갖고 실험하여 그 효능을 평가하였다. 이에 따른 실험 기법으로는 FACS, ELISA, 조직검사 기법 등을 사용하였고, 생존률과 단백뇨의 평가로 자가 면역 질환이 유발되는 MRL/MpJ-Faslpr mice에서 인삼부자탕이 미치는 영향을 평가하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 방제는 陽虛에 사용되는 人蔘附子湯 (IBT) 조성은 Panax Ginseng (인삼) 과 Aconitum carmichaeli (부자)을 동량으로 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2, 4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), collagenase, chloroform, RPMI-1640 및 IMDM medium, isopropanol, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Calf thymus DNA, formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD69-FITC, HRP conjugated, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG

Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A) 등이다.

4) 실험동물 및 사육 조건

본 실험을 위하여 사용된 MRL/MpJ-Faslpr mice는 7~8주령 암컷 생쥐로 Jackson Laboratory(U.S.A)에서 구입하였다. 고히사료(삼양사)와 물을 자유 식이 하였고, 1 일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하였고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. Conventional system으로 실온 22±2℃를 유지하여 1 주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 약물의 조제 및 투여

IBT 120 g을 증류수 1,000 ml에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 9 g의 분말을 얻었다. 얻어진 추출물 IBT 분말은 냉동 보관하여 필요한 농도로 증류수에 희석하였다.

MRL/MpJ-Faslpr mice는 10 마리를 한 군으로 하여 정상 발병군(대조군)과 처방 투여군으로 나누었다. 처방 투여군은 1 일 1 회 체중 1 kg 당 150 mg, 75 mg의 약물을 경구 투여하였고, 대조군은 같은 조건으로 증류수를 경구 투여하였다.

2) 알부민 수치 측정

신장 기능 이상으로 인해 발생하는 단백뇨의 측정을 위하여 생쥐의 소변을 ALBUSTIX Reagent Strip (Bayer HealthCare LLC., U.S.A)법으로 검사하였다. 생쥐의 단백뇨 정도를 0 mg/dl, 30 mg/dl, 100 mg/dl, 300 mg/dl, 1,000 mg/dl 5단계로 나누어 측정하였다.

3) 비장과 신장의 무게 및 형태, 세포 조성비의 변화 (FACS 분석)

10주령부터 약물처리를 시작하여 28 주령이 된 MRL/MpJ-Faslpr mice에 대해 ethyl ether

로 마취시키고 채혈한 후, 비장과 경부 림프절을 적출하여 무게를 측정하였고 생쥐 비장과 경부 림프절에서의 적출한 각 조직은 FACS 분석법을 통하여 세포의 조성비 변화를 측정하였다. MRL/MpJ-Faslpr mice의 spleen, 경부 lymph node를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2 회 세척한 후 cell strainer(FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들을 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 l of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2 회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 세포를 2×10⁵세포로 조정한 후 4℃에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CD8-FITC, anti-CD69-FITC, 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD19 등을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후, 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 MRL/MpJ-Faslpr mice의 비장세포와 림프절 세포에서 CD3, CD4, CD8, CD69, 그리고 CD19 등의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD3+:CD19+, CD4+:CD8+, CD3+CD69+ 세포 등의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

4) 항체 정량

생쥐에서 채혈한 혈액을 실온에서 응고시킨 후 원심분리하여 얻은 혈청에 대하여 항체를 정량하기 위하여 ELISA 법을 수행하였다. 96well-ELISA 플레이트에 0.1 M carbonate buffer에 용해된 goat anti-mouse IgG 항체 (total IgG 정량용) 또는 calf thymus DNA(anti-dsDNA 비교용)를 냉장상태에서 24 시간동안 코팅한 후, 0.1% BSA(Bovine serum

albumin)이 포함된 인산완충용액(PBS)으로 상온에서 2시간동안 블록킹하여 검사용 플레이트를 제조하였다. 이 플레이트의 각 well에 100 ~ 100,000 배로 희석된 생쥐의 혈청 100 μ l를 첨가하고 상온에서 2 시간동안 반응시킨 후 3 회 세척하고, 다시 1,000 ~ 100,000 배로 희석한 anti-mouse IgG/ HRP conjugated 항체 100 μ l를 첨가하고 역시 상온에서 2시간동안 반응하였다. 반응 후 각 well을 5 회 세척하고, TMB(tetramethylbenzidine) 용액을 100 μ l 씩 분주하여 암소에서 15 ~ 30분간 발색시킨 후 1 N 황산으로 반응을 중지시키고, ELISA reader로 450 nm에서 발색도를 측정하였다. Total IgG 정량 실험의 표준시료로는 0 ~ 1,000 ng/ml의 농도로 희석된 murine IgG 표준시료를 사용하여 각 실험값들을 정량하였다.

7) 조직학적 검사

MRL/MpJ-Faslpr mice의 조직학적 검사를 위하여 생쥐의 신장 조직을 적출하여 즉시 10% Formalin-중성인산완충용액에 담가서 고정하였다. 이 조직들을 각각 파라핀에 담근 후 4- μ m 조각 층으로 만들고 H&E, Congo red, Giemsa 염색을 통하여 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

8) 통계 분석

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 평균값 \pm 표준편차로 기록하였으며, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법과 그래픽패드(GraphPad Software Inc., U.S.A)를 이용하여 결정하였다. 특별한 언급이 없는 경우, 실험값이 95% 유의성이 인정되는 경우 유의한 것으로 판단하였다.

III. 실험 결과

1. 생존율

MRL/MpJ-Faslpr mice에서 SLE의 주요 사망 질환인 신장 기능에 대한 IBT 처방의 효과를 fraction survival로 비교하였다(Fig. 1). 실험종료 시점에서 대조군의 생존율은 75% 정도로 나타났고 처방 투여군의 경우 저·고용량 투여군

(Low-High)는 각각 50%, 100% 정도의 생존율을 보였다.

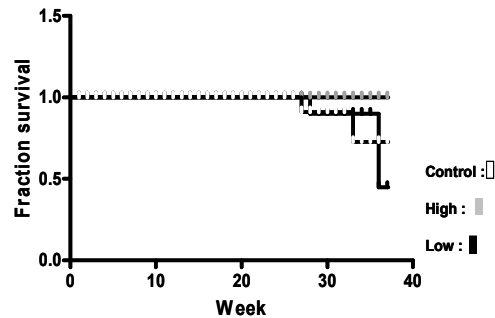


Figure 1. Time to development of renal disease in MRL/MpJ-Faslpr mice survival.

The MRL/MpJ-Faslpr mice were administered with IBT for 18 weeks daily. Control group mice were administered with D.W. instead of IBT. The time to appearance of renal disease was significantly decreased in IBT 150 mg/kg(High), 75 mg/kg(Low) groups compared with controls. Performed statistical analysis for survival using GraphPad Prism 3 software(GraphPad Software Inc., U.S.A)

2. 단백뇨 발생 및 변화

MRL/MpJ-Faslpr mice의 신장 기능 저하 및 파괴로 인한 단백뇨 발생에 IBT 처방이 미치는 영향을 확인하기 위하여, 정량된 알부민 양을 근거로 단백뇨 정도를 5단계로 나누어 비교하였다. 단백뇨를 측정된 결과, 15 주 이상부터는 대부분의 mice에서 단백뇨가 발생하였으며, 20 주 이후부터는 각 그룹별 차이를 확인할 수 있었다. 실험종료 시점인 28 주에서는 통계상 유의성은 보이지 않았지만, 13주에서 27주까지 IBT 고용도 투여군과 대조군의 차이가 보였다(Fig. 2).

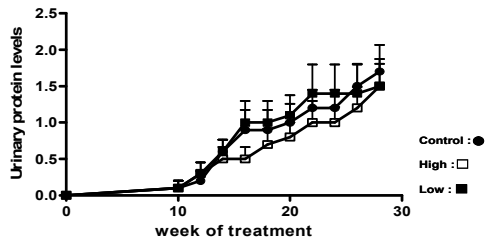


Figure 2. Urinary protein levels in MRL/MpJ-Faslpr mice. The MRL/MpJ-Faslpr mice were administered with IBT 150 mg/kg (High), 75 mg/kg(Low) for 18 weeks daily. Urinary protein levels were assessed and graded semi-quantitatively as described in Methods (n=10). Performed statistical analysis for survival using GraphPad Prism 3 software(GraphPad Software Inc., U.S.A) (grade 0 ; 0 mg/dl, grade 1 ; 30 mg/dl, grade 2 ; 100 mg/dl, grade 3 ; 300 mg/dl, grade 4 ; 1,000 mg/dl - ALBUSTIX Reagent Strips, Bayer Diagnostics Mfg., U.K.)

3. 비장 및 신장의 중량 변화

MRL/MpJ-Faslpr mice는 비정상적인 면역세포의 증식을 가져오고, 이러한 증식은 림프기관의 병적인 성장(lymph-adenopathy)을 야기한다¹²⁾. IBT 처방을 28 주간 투여한 결과, MRL/MpJ-Faslpr mice의 비장과 신장의 중량을 측정하여 수치화하였다(Fig. 3). 비장의 경우 대조군의 330±68.8 mg에 비하여 저·고용량 투여군(Low·High)은 각각 252±19.2 mg, 254±71.6 mg로 감소하였으나, 통계적 유의성은 보이지 않았다(Fig. 3A). 신장의 경우 대조군의 272±47.3 mg에 비하여 저·고용량 투여군(Low·High)은 각각 235±36.3 mg, 255±21.7 mg로 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3B).

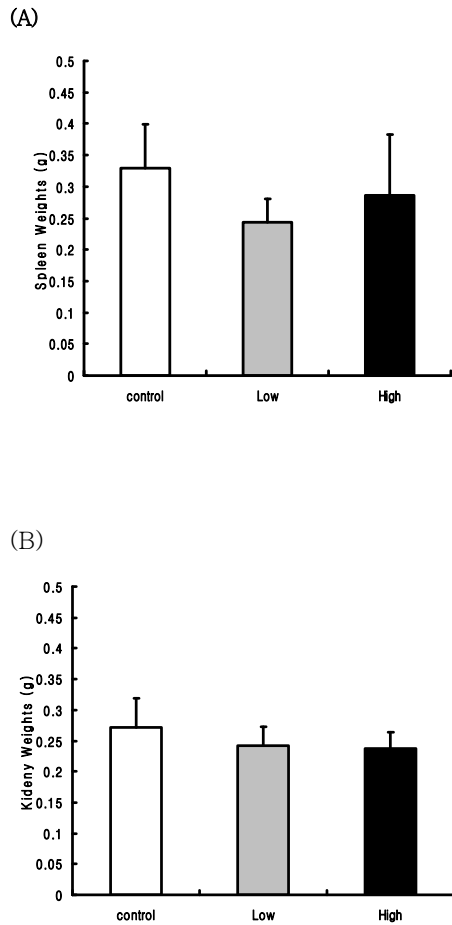


Figure 3. The MRL/MpJ-Fas^{lpr} mice were administered with IBT 150 mg/kg (High), 75 mg/kg (Low) for 18 weeks daily(p.o). Mean weights were reduced by the treatment of IBT, but the differences were not statistically significant (n=5). Results are mean ± SD.

(A) Comparison of Weights between spleens in a IBT and MRL/MpJ-Faslpr mice(18 weeks).
 (B) Comparison of Weights between Kidneys in a IBT and MRL/MpJ-Fas^{lpr} mice(18 weeks).

4. 경부 림프절 및 비장 세포 조성비

IBT 처방이 MRL/MpJ-Faslpr mice의 각 기관에서 면역세포의 구성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 마우스의 림프절 및 비장에서 분리한 세

포들의 구성비를 FACS 분석법을 통하여 확인하였다. 경부 림프절에서의 분석 결과(Table 1), IBT 투여군의 경우 CD3+, CD3+ CD69+, CD4+, CD8+ 를 조사한 결과 통계적 유의성이 없었다. 다만, 저용량 투여군이 CD3+, CD4+, CD8+ 등 T 세포 계열에서는 대조군에 비하여 증가하였고 CD19+ 의 B 세포 계열에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 비장 조직 세포의 분석결과(Table 2), IBT 투여군의 경우 CD3+, CD3+CD69+, CD4+, CD8+ 의 T 세포 계열 조성비는 정상쥐와 대조군에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였고, CD19+ 의 B 세포 조성비는 감소하는 경향을 보였지만 전반적으로 통계적인 유의성은 없었다.

Table 1. Effects of IBT on the Cell Contents of Lymph Nodes from MRL/MpJ-Faslpr

Leucocytes Type	Organ	Normal Balb/c	MRL/MpJ-Faslpr mice		
			control	Low	High
CD3+(T)	LN [#]	73.29±2.6 4	89.9±3.9	92.2±0.89	89.5±2.67
CD19+(B)	LN	25.67±1.6 5	10.25±3.45	7.07±0.88	8.9±1.74
CD3 + CD69 +	LN	4.62±0.23	50.25±0.75	50.87±1.9	49.87±1.36
CD4+	LN	66.27±1.6 5	18.4±5.2	18.43±2.51	13.73±0.98
CD8+	LN	17.7±1.1	18.7±1.4	23.43±1.99	21.93±3.42

LN: Lymph node . The MRL/MpJ-Faslpr mice were administered with IBT 150 mg/kg (High), 75 mg/kg (Low) for 18 weeks daily. Results are mean ± SD (n=5 mice per group).

Table 2. Effects of IBT on the Cell Contents of Spleens from MRL/MpJ-Faslpr

Leucocytes Type	Organ	Normal Balb/c	MRL/MpJ-Faslpr mice		
			control	Low	High
CD3+ (T)	SP [#]	49.62±2.14	46.8±4.4	65.13±9.54	44.9±2.21
CD19+ (B)	SP	40.41±1.65	33.25±5.95	20.37±9.39	38.47±1.67
CD3 + CD69 +	SP	27.64±0.23	25.85±3.0	35.33±8.51	23.47±1.21
CD4+	SP	25.1±1.65	16.35±0.55	24.4±5.57	17.77±0.84
CD8+	SP	16.4±1.1	17.6±3.3	26.3±3.93	18.57±3.17

SP: spleen. The MRL/MpJ-Faslpr mice were administered with IBT 150 mg/kg (High), 75 mg/kg (Low) for 18 weeks daily. Results are mean ± SD (n=5 mice per group).

5. 혈액내 항체 정량

IBT 처방이 자가면역 항체의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여, MRL/MpJ-Faslpr mice 의 혈액에서 ELISA법을 이용하여 항체를 분석하였다. IgG와 anti-dsDNA IgG 분석 결과, 생쥐의 혈액 내 총 IgG 양은 대조군, 저·고용량군 순으로 각각 9.02±1.142, 9.47±1.146, 9.986±2.137로 증가하는 수치를 보였지만 통계상 유의성은 없었다(Fig. 4A). SLE 발병에 특징적으로 나타나는 자가면역항체인 anti-dsDNA IgG2, 13)는 자가면역증상의 발생과 진행에 있어서 중요한 지표로 면역학적인 증거가 된다. anti-dsDNA IgG 분석 결과, 대조군, 저·고용량군 순으로 각각 6.76±0.63, 6.84±2.35, 6.94±1.90으로 통계적으로 유의성 있는 변화는 확인할 수 없었다(Fig. 4B).

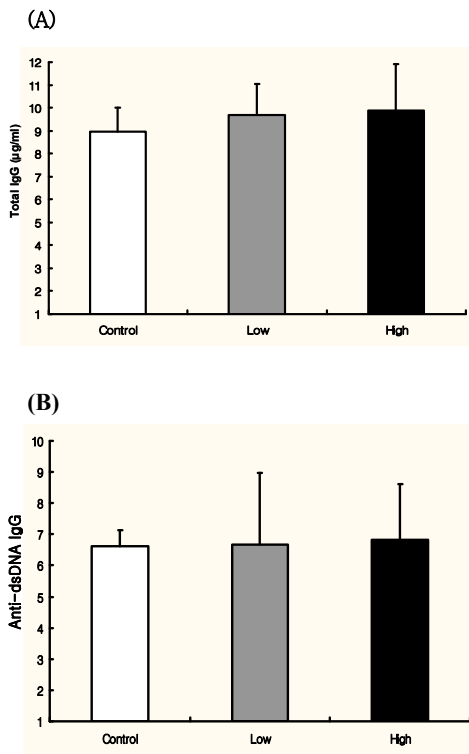


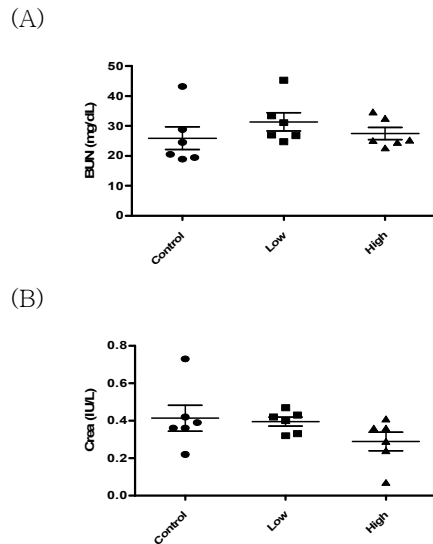
Figure 4. Determination of Total IgG(A) Anti-dsDNA(B) concentrations of sera from MRL/MpJ-*Fas^{lpr}* mice. The MRL/MpJ-*Fas^{lpr}* mice were administered with IBT 150mg/kg (High), 75 mg/kg (Low) for 18 weeks daily. Total IgG concentrations were analyzed by ELISA method as described in Methods section. Results are mean ± SD (n=5 mice per group). IBT didn't make the significant changes in the total IgG concentration of treated groups.

6. 혈청학적 영향

IBT 처방이 MRL/MpJ-*Fas^{lpr}* mice에 미치는 혈청학적 영향을 확인하기 위하여, 생쥐의 혈액에서 혈청을 획득하여 혈액 내 BUN, Creatinine, CK의 활성 측정하였다. 분석 결과 생쥐의 혈액 내 BUN, Creatinine, CK의 활성 측정이 IBT 처방 투여군에서 통계적으로 유의성있는 변화를 확인하지 못했다. (Fig. 5).

BUN은 혈액내의 요소 질소 양으로, 혈액 내

요소 농도는 직접적으로 신장의 배설 기능과 관련이 있으므로 신장 기능의 지표가 된다. 본 연구에서 대조군, 저·고농도 투여군은 각각 25.89 ± 9.256 mg/dl, 31.10 ± 6.25 mg/dl, 27.46 ± 5.249 mg/dl로 통계적 유의성있는 변화는 없었다(Fig. 5A). Creatinine은 BUN에 비하여 변화가 낮고 쉽게 잘 오르내리지 않으므로 신장 기능의 확실한 지표로 사용된다. 본 연구에서 대조군, 저·고농도 투여군은 각각 0.413 ± 0.169 IU/L, 0.394 ± 0.0974 IU/L, 0.294 ± 0.1674 IU/L이었다. 전체적인 통계적 유의성은 없었지만 저농도와 고농도 투여군이 대조군에 비하여 순차적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5B). 크레아틴 키나제(creatine kinase, CK)는 생체 내에서 골격근, 심근, 뇌 및 평활근에 고농도로 존재하고 있지만 기타 조직 및 장기에는 거의 존재하지 않는다. 그러므로 혈청 CK 활성 측정으로 이 효소가 많이 함유된 장기의 손상 또는 세포막의 투과성 변화를 파악할 수 있다. 본 연구에서 대조군, 저·고농도 투여군은 각각 6116.50 ± 6135.02 IU/L, 3298 ± 4538.09 IU/L, 5724.17 ± 6053.17 IU/L이었다. 대조군에 비하여 상대적으로 저농도, 고농도 투여군에서 평균값이 감소하였으나 통계적 유의성이 없었다(Fig. 5C).



(C)

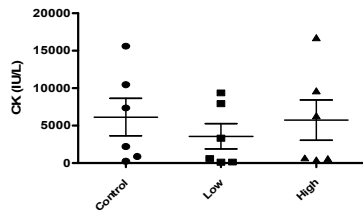


Figure 5. Determination of BUN(A), creatinine(B), CK(C) levels of sera from MRL/MpJ-Faslpr mice. The MRL/MpJ-Faslpr mice were administered with IBT 300 mg/kg (High), 150 mg/kg(Low) for 18 weeks daily. Determination of Creatinine Serum Biochemical Parameter from MRL/MpJ-Faslpr mice by method as described in Methods section. Results are mean \pm SD (n=6 mice per group). *p < 0.05 versus control group. Performed statistical analysis for GraphPad Prism 3 software (GraphPad Software Inc., U.S.A) [Biochemistry analyzer 7080, HITACHI, Japan]

7. 신장의 조직학적 검사

SLE에서 신장의 소견은 진단기준에 따라 다양하지만, WHO 분류기준(Modified 1982)¹³⁻¹⁴에 따라 다음과 같이 구분하여 관독하였다. 사구체에 축적되는 아밀로이드는 특징적으로 콩고레드(Congo red) 염색 후 변염색성으로 분홍색을 띠어 확인된다. 특히 아밀로이드는 각 장기에 공통적으로 기저막에 인접하여 세포 간에 축적이 시작되며, 아밀로이드의 침착이 호발하는 부위는 신장, 비장, 간 및 심장 등이다. 신장에서의 아밀로이드 침착은 육안적으로 신장이 다소 커지고 회백색이며 조직학적으로 사구체를 주로 침범하여 아밀로이드 축적이 일어나 사구체기저막이 두터워진다¹⁵. 또한 사구체내 아밀로이드의 침착정도, 염증세포의 분포의 정도(severity)의 경우에도 군 간의 차이는 관찰되지 않았다. 유발에 관한 개체차이가 크므로 그룹간 의미는 없다고 판단된

다. Giemsa stain을 시행하여 염증부위내의 산호성백혈구 및 비만세포, 백혈구의 침윤 정도를 광학현미경을 이용하여 관찰¹⁷하여 사진을 촬영하고 분석하였다(Fig. 6-8)

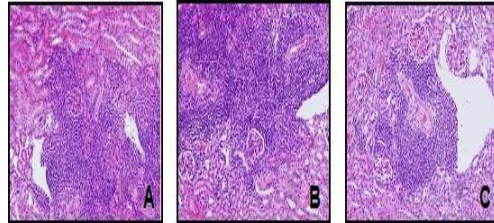


Figure 6. Effect of IBT on the histopathology of kidney in MRL/MpJ-Faslpr mice. Representative photographs of glomerular areas of kidney were processed for histology as described in material and methods. Mice were treated with D.W. (A) 300 mg/kg(High), 150 mg/kg(Low) for IBT (B and C) following the detection of kidney. Kidneys were removed and stained with hematoxylin. Representative kidney of mice from each group are shown. Original magnification 200 \times .

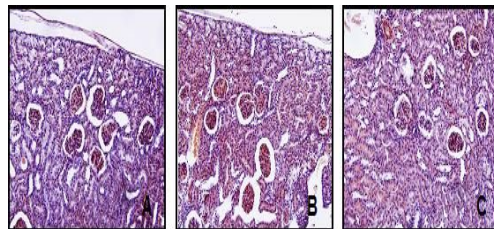


Figure 7. Effect of IBT on the histopathology of kidney in MRL/MpJ-Faslpr mice. Representative photographs of glomerular areas of kidney were processed for histology as described in material and methods. Mice were treated with D.W. (A) 300 mg/kg(High), 150 mg/kg(Low) for IBT (B and C) following the detection of kidney. Kidneys were removed and stained with Congo Red. Representative kidney of mice

from each group are shown. Original magnification 200×.

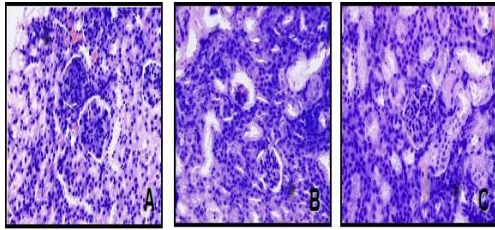


Figure 8. Effect of IBT on the histopathology of kidney in MRL/MpJ-Faslpr mice. Representative photographs of glomerular areas of kidney were processed for histology as described in material and methods. Mice were treated with D.W. (A) 300 mg/kg(High), 150 mg/kg(Low) for IBT (B and C) following the detection of kidney. Kidneys were removed and stained with Giemsa. Representative kidney of mice from each group are shown. Original magnification 400×.

IV. 고찰

전신성 홍반성 루푸스(SLE)는 병적인 자가항체와 면역복합체에 의해서 조직 및 세포가 손상을 받는 원인 불명의 질환이다. 전형적인 임상증상은 발열, 안면에 나비모양의 발진, 홍반, 관절염, 낭창성 신염, 경련발작 등의 중추신경계 증상과 심막염, 흉막염, 폐렴, 용혈성 빈혈, 백혈구 및 혈소판 감소 등이다^{2, 13)}. 최근 정밀한 검사법의 발달에 따라 환자가 증가하는 추세이다. 대부분의 루푸스 환자에서 사구체에 면역글로불린 침착이 관찰되지만 이들 중 단지 반 수에서만 단백뇨가 나타나는 임상적인 신염을 유발한다. 질환 초기에는 일부에서 신증후군의 부종증세가 발생하는 경우도 있지만 대부분에서는 증상이 없다. 소변검사에서는 혈뇨, 단백뇨, 원주뇨 소견을 보일 수 있다. 지속적으로 소변 검사상 이상을 보이거나, 항 ds-DNA 항체가 높이 증가하거나, 혈중

보체가 감소한 경우는 심한 신염의 위험성이 높다. 신생검이 치료를 결정하는데 지침이 된다. 낭창성 신염은 SLE의 이환 및 사망의 주된 원인이므로 그 진단 및 예후에 미치는 요인들에 대한 연구보고는 많지만 아직 논란의 여지가 있다.

면역복합체질환이란 신장의 사구체나 혈관벽과 같은 특정 장기나 조직에 면역복합체의 침착에 의해 매개되는 질환군을 말하며, 일반적으로 이러한 면역침착은 혈액 순환 내에 형성된 항원항체 결합으로부터 야기되며, 어떤 경우에는 항원은 자체이거나 자가항원이다. 임상적으로 SLE 진단 후 첫 1년 이내에 50% 환자에서 신염이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이는 신장에 면역 복합체가 침착되면서 시작된다. 신병변에 관계되는 주항원은 double-stranded (ds) DNA 또는 single-stranded (ss) DNA이며, 이에 대한 항 DNA 항체가 결합하여 혈중 면역복합체를 형성한다¹⁴⁾.

본 연구에 사용된 MRL/MpJ-lpr/lpr mice는 MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr, 혹은 MRL/MpJ-Faslpr 이라고도 불리며, 림프증식의 자연적 돌연변이에 동중접합형(homozygous)의 유전형질을 갖고 있다. 핵심 리간드인 Fas (APO-1/CD95)는 림프구, 섬유아세포, 내피세포, 상피세포 등 여러 세포의 표면에 발현하여 세포사멸을 매개하는 세포 표면 단백 항원이다¹⁶⁾. 이들은 전신적 자가면역과 대규모의 림프선비대를 보이며 이는 비정상적인 T세포의 증식과 연관되어 있으며, 관절염 및 면역복합체(immune complex) 축적에 의한 사구체신염 등이 동반되기도 한다. 본 연구에 사용된 루푸스의 병인으로 Fas가 관련이 있을 것이라는 가설도 본 루푸스의 동물 모델인 MRL lpr/lpr 마우스에서 비롯되었다¹⁷⁻¹⁸⁾. Fas 유전자의 돌연변이가 lpr/lpr 마우스에서는 항DNA 항체의 증가와 림프절 종대, 림프선 신장염, 활막염 등 인간의 루푸스와 유사한 증상이 나타내므로 Fas의 이상의 동물모델을 자가면역 세포의 자연적인 세포사멸에 장애를 초래하여 루푸스가 발생하는 것으로 가정하여 루푸스 동물모델로 사용되어 왔다. Fas의 이상이 인간에서는 Fas의 변이에 의

한 림프구의 세포사멸 이상으로 autoimmune lymphoproliferative syndrome(ALPS)이 보고된 바 있지만¹⁹⁾ 실제 루푸스로 진단된 경우는 극히 드문 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 또한 루푸스 환자를 대상으로 한 많은 연구에서 Fas의 발현이 오히려 증가되었다²¹⁾.

본 연구에 사용된 MRL/MpJ-lpr/lpr mice는 MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr, 혹은 MRL/MpJ-Faslpr 이라고도 불리며, 림프증식의 자연적 돌연변이에 동종접합형(homozygous)의 유전형을 갖고 있다. 이들은 전신적 자가면역과 대규모의 림프선 비대를 보이며 이는 비정상적인 T세포의 증식과 연관되어 있으며, 관절염 및 면역복합체(immune complex) 축적에 의한 사구체신염 등이 동반되기도 한다. MRL/MpJ-lpr/lpr mice에서의 Fas 유전자의 돌연변이는 결국 비정상적인 자가면역성 림프구들의 과다증식을 허용하게 되므로 전신적인 자가면역질환으로 발전하게 되므로 사람의 SLE와 유사한 임상적 형태를 나타나게 된다.

中醫學에서는 1980년대부터 SLE에 대하여 꾸준한 기초연구^{11, 22-23)} 및 임상연구²⁴⁻²⁵⁾를 하였고 靑蒿·雷公藤·丹蔘²⁶⁻²⁸⁾ 등의 SLE 치료효과를 밝혔지만, 국내의 한의학적 연구로는 SLE의 병인·병리·치법 등에 관한 약간의 문헌적 고찰²⁹⁻³⁰⁾이 있었고, 太陰人 淸心蓮子湯의 투여로 호전된 SLE 1례를 보고하였으며³¹⁾, 滋腎活血湯이 동물 모델에 미치는 영향에 대한 연구³²⁾ 정도가 진행되었을 뿐, 많은 연구가 진행되지 않았다.

한의학에서는 SLE와 동일한 병명을 논하기는 어려우나 임상적인 症狀를 위주로 살펴보면, 류마티스 질병은 痺病 혹은 風濕病證 범주에 속하고, 계통성 홍반성 낭창은 周痺·癩痺·紅斑痺에 속하며, 낭창성 발열은 痺熱·周痺熱·癩痺熱에 속하고, 낭창성 皮疹·紅斑은 丹疹·赤丹·陰陽毒·陽毒發斑에 속하는데 그 중에 나비형 紅斑은 蝴蝶丹, 盤狀 紅斑은 鷄冠斑, 광선 민감성은 日晒瘡에 속하며, 구강궤양은 口疳·口舌瘡에 속하고, 낭창성 관절염은 周痺·行痺·熱痺에 속하며, 레이놀즈 현상은 肢端脈痺에 속하고, 망상 靑斑은 魚網斑·網狀靑斑에 속하며, 紫斑은 肌衄·紫斑·葡萄斑에 속

하고, 수족혈관염은 瘀血痺·瘀脈痺에 속하며, 지단괴사·괴저는 脫疽에 속하고, 흉강축수는 懸飲에 속하며, 심낭축수는 心包飲·心水에 속하고, 낭창성 심근염은 心損證에 속하며, 적혈구·백혈구 감소는 血損證·血損眩暈證에 속하고, 혈소판 감소는 血損證·衄證에 속하며, 낭창성 신염은 腎着證·腎損證에 속하고, 저단백혈증은 水腫證·腎水證에 속하며, 낭창성 폐렴은 肺損證에 속하는데 호흡미약이 동반되면 支飲·喘證에 속하고, 낭창성 중추손상은 胸損證·癩證·癩狂症·頭痛에 속하며, 구안건조는 燥證·燥痺證¹⁰⁾에 속한다. 본 연구에 관련이 있는 낭창성 신염은 『金匱要略』의 ‘腎着’에 해당한다고 보고 있다.

證候學적으로 살펴보면 임상적으로 毒熱熾盛, 氣陰兩虛型, 脾腎陽虛型, 脾虛肝鬱型, 風濕熱痺型, 陰虛火旺型, 熱盛型, 肝腎陰虛型, 兩虛型, 陰虛型, 陰陽兩虛型, 肝鬱氣滯型, 心脾兩虛型, 瘀血痺阻型, 肝鬱血瘀型, 熱毒傷陰型, 氣滯血瘀型, 肝鬱血熱型 등으로 구분할 수 있으나 결국 氣血陰陽의 虛症으로 주로 脾腎兩虛 또는 氣陰不足으로 보고 치료한다. 治法은 變證類型에 따라 淸熱解毒, 涼血散瘀, 滋陰涼血, 氣血雙補, 養心安神, 溫補脾腎, 壯陽利水, 養肝利氣, 活血 등을 조합하여 사용하는데, 특히 평소에는 補氣滋陰 또는 溫補脾腎을 바탕으로 사용하되, 급성기에 淸熱解毒과 涼血散瘀의 방법을 추가하여 사용한다³²⁻³⁵⁾. 한의학에서 신장질환을 보면 사구체 질환의 초기에는 대부분이 屬實屬熱이나, 久病이 되면 屬虛屬寒하며, 때로는 寒熱虛實이 錯綜되어 나타나기도 한다. 사구체 질환은 外邪侵襲後에 肝腎虛損으로도 유발될 수 있는 바 생체의 眞氣 즉, 元氣가 內守하지 못하여 陰陽이 失調된 것으로 臟腑·經絡·營衛氣血의 氣機가 착란되므로 風熱痰飲 등의 病邪가 유발되고 이러한 소산적 물질 등이 생리개변을 초래하여 비생리적 물질을 소산시켜서 질병을 유발시킨다³⁶⁾. 따라서 신장질환은 장기적으로는 元氣를 도울 수 있는 腎陽을 補해야 한다. 또한 자가면역 질환은 대부분 氣虛로 인식된 바 大補元氣할 수 있는 인삼과 같은 약재가 많이 사용되고 있다.

중국 명의경험방¹⁰⁾에서 인삼, 부자유 등 補氣 補陽하는 약재를 응용하여 脾腎陽虛로 인한 낭창성 신염을 치료한 경우를 많이 찾아 볼 수 있으며 만성질환으로 虛寒으로 보아 본 실험에서는 腎陽虛 腎炎 처방에 반응되고 있는 인삼과 부자유를 선용하여 실험하였다. 부자유는 熱有毒하며 辛甘하여 心脾腎經에 入한다. 回陽補火散寒除濕의 효능이 있어 腎陽不足을 다스린다. 인삼은 微溫無毒하며 甘微苦하여 脾肺心經으로 入한다. 大補元氣固脫生津의 효능이 있어 면역증강력에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 이런 관점의 처방을 구성하여 Fas 리간드 이상의 루푸스 모델에 적용하였는데, 생존률 등 양호한 지표를 보인 면도 있고 실험 성적의 변화가 유의성이 없었던 면도 있었다. 향후 루푸스 모델에 대한 한의학적 접근은 변증별 구분을 통한 접근이 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 실험에서는 人蔘附子湯을 사용하여 전신성 홍반성 낭창 모델로 자가 면역 질환이 유발되는 MRL/MpJ-Faslpr 마우스를 대상으로 생존률, 단백뇨, immune complex, 혈청학적 변화 등에 대한 영향을 확인한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

MRL/MpJ-Faslpr 마우스에서 15 주 이상부터 단백뇨가 나타났고, 20 주 이후부터는 각 그룹별로 차이를 확인할 수 있었으며, 30 주에서는 통계상 유의성은 보이지 않았다. 림프절에서 CD3+, CD3+ CD69+, CD4+, CD8+ 의 세포 조성비는 통계적 유의성이 없었다. 다만, 저용량 투여군이 CD3+, CD4+, CD8+ 등 T 세포 계열에서는 증가하였고, CD19+ 의 B 세포 계열에서는 감소하는 경향을 보였다. 비장 조직 세포에서 CD3+, CD3+ CD69+, CD4+, CD8+ 의 T 세포 계열 조성비는 증가하는 경향을 보였고, CD19+ 의 B 세포 조성비는 감소하는 경향을 보였다. 생쥐의 혈액 내 총 IgG 양은 대조군, 저용량, 고용량군 순으로 증가하였지만 큰 변화는 없었다. Anti-dsDNA IgG 분석결과 통계적으로 유의성

있는 변화는 확인할 수 없었다. 혈중 BUN은 통계적 유의성 있는 변화가 없었다. 혈중 Creatinine은 전체적으로 통계적 유의성은 없었지만 저, 고용량 투여군 모두 순차적으로 감소하는 경향을 보였다. 혈중 크레아틴 키나제는 저용량, 고용량 투여군에서 평균값이 감소하였다.

참 고 문 헌

1. 양용석 외. 면역혈청학. 서울, 라이프사이언스, p.367, 2004.
2. Kurtz J. Lssebacher. Harrison's 내과학. 서울, 정담, pp.1771-1776, 1997.
3. 이수곤 역. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울, 정담, pp.42-46, 2002.
4. 전국 의과대학 임상교수 편. Color Atlas 임상의학. 서울, 한우리, pp.13-15, 2000.
5. 김형섭. 내과학(5권. 감염·류마티스·알러지). 서울, 고려의학, pp.267-277, 2003.
6. Ward MM, Pyun E, Studenski S: Causes of death in systemic lupus erythematosus. Long-term followup of an inception cohort. Arthritis Rheum, 38(10):1492-9, 1995.
7. Pettersson T, Pukkala E, Teppo L, Friman C: Increased risk of cancer in patients with systemic lupus erythematosus, Ann Rheum Dis, 51(4):437-9, 1992.
8. Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. Cell 85:303-6, 1996.
9. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annu RevImmunol 10:267-93, 1992.
10. 沈丕安. 紅斑狼瘡 中醫臨床研究. 北京, 人民衛生出版社, pp.4-10, 50, 1999.
11. 전국한의학대학교 본초학교실. 본초학. 서울, 영림사, pp.322, 531-532, 1991.
12. M. H. Park, et al., Tubulointerstitial

- disease in lupus nephritis: Relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis, *Nephron* 44:310, 1986.
13. 이연태. 최신면역학. 서울, 집문당, pp. 398-399, 1989.
 14. 박성환. 전신성 홍반성 루푸스 환자의 신장 질환. 류마티스 건강학회지 Vol.3, No.2, 231-239, 1996.
 15. Vivette D. D'Agati, Agnes B. Fogo, Jan A. Bruijn, J. Charles Jennette, Pathologic Classification of focal Segmental Glomerulosclerosis: A working Proposal, *American journal of kidney diseases*, 43(2):368-382, 2004.
 16. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-5, 1989.
 17. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-7, 1992.
 18. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969-76, 1994.
 19. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335:1643-9, 1996.
 20. Vaishnav AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, et al. The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/ APO-1) mutations. *Arthritis Rheum* 42:1833-42, 1999.
 21. Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, Herrmann M, Kuhnel A, Manger B, et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 40:306-17, 1997.
 22. 李曉宇, 中醫藥治療紅斑性狼瘡, 陝西中醫學院學報, 11(3):28-29, 1998.
 23. 姜泉, 系統性紅斑狼瘡中醫辨證分型與血清免疫指標的關係, 中國中醫藥信息雜誌, 2(10):17, 1995.
 24. 周楚漢 等, 中醫辨證分型治療系統性紅斑狼瘡118例療效分析, 中西醫結合雜誌, 10(2):108-109, 1990.
 25. 孫年樣, 清熱化瘀治療狼瘡性腎炎100例, 江蘇中醫, 17(12):16, 1996.
 26. 余其斌 等, 青蒿琥酯治療紅斑狼瘡56例, 中華皮膚科雜誌, 30(1):51-52, 1997.
 27. 憑樹芳 等, 雷公藤對女性SLE性激素水平的影響, 中華皮膚科雜誌, 22(1):3, 1989.
 28. 張國強 等, 丹蔘對狼瘡性腎炎成纖維細胞增殖, 調亡及G-myc蛋白表達的影響, 中國中西醫結合雜誌, 17(8):473, 1997.
 29. 정현아 외, 전신성홍반성낭창에 대한 문헌적 고찰, 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌, 15(1):356-83, 2002.
 30. 이석우 외, 전신성홍반성낭창의 東醫病理 및 治法에 관한 고찰, 대한한의학회지, 16(1):51-70, 1995.
 31. 안창석 외, 전신성홍반성낭창(SLE)환자 1례에 대한 증례보고, 대한약침학회지, 3(2):245-55, 2000.
 32. 催勳燮, 滋腎活血湯이 全身性紅斑性狼瘡

- 동물모델에 미치는 影響, 대전대학교 한의
학대학원 박사학위논문, 2005.
33. 金起鳳·周德瑛, 中醫皮膚科學, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.260-268, 2000.
 34. 徐宜厚, 皮膚病中醫診療學, 北京, 人民衛生出版社, pp.150-151, 1997.
 35. 陳以平, 腎病的變證與辨病治療, 北京, 人民衛生出版社, pp.125-130, 1997.
 36. 김덕곤 外. 동의소아과학. 서울, 정담사, 2002, pp. 611-614.