



Original Article / 원저

Type II Collagen으로 유도된 관절염에 대한 羌活, 獨活 배합약물의 억제 효과

윤호석¹·이영철¹·이장천^{2*}

¹상지대학교 한의과대학·²부산대학교 한의학전문대학원

Inhibitory Effect of a Decoction Combined with *Ostericum koreanum* Maxim. and *Aralia continentalis* Kitagawa on Collagen II -induced Arthritis Mice

Ho-Suk Yoon¹ · Young Cheol Lee¹ · Jang-Cheon Lee^{2*}

¹College of Korean Medicine, Sangji University,
²School of Korean Medicine, Pusan National University.

ABSTRACT

Objectives : To clarify the anti-arthritic activity of *Ostericum koreanum* Maxim. (OS) plus *Aralia continentalis* Kitagawa (AC) in vivo.

Methods : All mice were immunized with bovine type II collagen. After a second collagen immunization, mice were treated with OS plus AC once a day for 7 weeks. Oral administration of OS plus AC (200 or 50 mg/kg) significantly suppressed the progression of CIA, which extend is comparable to that of methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg), a positive control. The severity of arthritis within the knee joints was evaluated by histological assessment of cartilage destruction and pannus formation.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This is an open access journal which permits unrestricted access via the internet (URL, <http://www.ompak.okdanche.com>.) non-commercial use, distribution, reproduction and providing the original work is properly cited.

Results : Administration of OS plus AC significantly suppressed the progression of CIA and inhibited the production of TNF- α and IL-6 in serum. The erosion of cartilage was dramatically reduced in mouse knees after treatment with OS plus AC. In conclusion, our results demonstrates that OS plus AC significantly suppressed the progression of CIA and that this action was characterized by the decreased production of IL-6, IFN- γ and collagen II specific antibody in serum, CD3+CD69+ T cells, MHC class II+/CD11c+ (in DLN), CD11b+Gr-1+ cells (in PBMC), CD11b+Gr-1+ cells, B220+/CD23+ (in paw joint).

Conclusions : The the levels of IFN- γ in the culture supernatant of splenocytes stimulated with CD3/CD28 or collagen were dramatically decreased, while those of IL-4 was increased. In the serum of OS and AC-treated mice, the levels of IgM RA factor were decreased.

Keyword : *Ostericum koreanum* Maxim., *Aralia continentalis* Kitagawa, Collagen II-induced arthritis.

I. 서 론

류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA) 은 아직 원인이 밝혀지지 않은, 주로 관절을 침범하는 만성, 전신성, 염증성 질환으로 조조강직, 대칭적 관절침범, 손 관절을 잘 침범하는 등의 특징이 있으며¹⁾, 일반적으로 말초 관절부터 시작해 점점 근위관절로 진행하게 된다. 염증이 잘 조절되지 않은 경우에는 계속 자라는 활성화된 활막조직에 의해 주위의 연골과 뼈가 파괴되어 관절의 변형이 초래된다²⁾.

류마티스 관절염의 원인은 아직 완전히 알려지지 않은 상태이나, 자가면역 기전으로 인한 염증 반응으로 이해되고 있으며, 발병에는 유전적 소인과 환경적인 요인이 모두 영향을 미치는 것으로 추측되고 있다.

류마티스 관절염의 활막에서 발견되는 사이토카인은 주로 대식세포와 활막세포로부터 분비되며, 주변의 염증 세포들을 활성화, 유입시키고 활막세포의 증식을 촉진하여 활막염을 항진, 지속시킨다³⁾. 활막에서 발견되는 여러 가지 사이토카인으로서 IL-6, DM-CSF, IL-8, 각종 chemokine 및 단백 분해효소와 같은 아위 염증매개물의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고 활막세포의 증

식을 항진시켜 관절의 손상을 일으킨다. 최근 개발되어 사용 중인 TNF- α 차단제가 류마티스 관절염에 높은 효과를 나타냈음은 사이토카인이 염증 지속과 활막증식에 중요한 역할을 함을 시사한다⁴⁾. 연골과 골의 파괴는 주로 활막내 세포들에서 만들어지는 단백분해효소와 기질로 파괴되는 pannus의 침투로 야기된다⁵⁾.

강활은 미나리과에 속한 다년생본초로 강호리 *Ostericum Koreanum* Maximowicz의 뿌리, 중국강활 *Notopterygium incisum* Ting 혹은 寬葉羌活 *Notopterygium forbesii* Boissier의 근경 및 근을 기원으로 한다. 羌活의 性味는 雄烈하여 發汗解熱作用이 비교적 強하므로 解表에 적합하며 藥理作用으로는 祛風解表, 祛風濕, 止痛이며 外感風寒, 風濕, 痺痛治療에 사용한다^{6,7)}.

독활은 두릅나무과(五加科: Araliaceae)에 속하는 독활 *Aralia continentalis* Kitagawa의 근으로 性味는 비교적 淡하고 和緩하여 除濕의 作用이 強하다. 藥理作用으로는 祛風濕, 通經絡이며, 鎮痛, 鎮靜, 血管擴張 作用이 있으며 風濕으로 인한 痺痛과 頭痛 治療에 活用한다^{6,7)}. 강활은 상초에 작용하여 거풍습에 강하고, 顛頂部로 直上하고 脂臂로 橫行하여 消산해표하는 효능으로 遊風頭痛, 풍습골절동통 등의 증상을 치료한다. 독활은 주로 하초에 작용하여 거풍습하고 통행기혈하여 伏風頭痛, 腰腿膝足濕痺 등의 증상을 치료한다. 강활과 독활의 배오는 <外台秘要>에서 나왔고, 두 약을 配用하면 一上一下로 족태양방광경에

*교신저자 : 이장천, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· Tel : 051-510-8459

· Email : jcl7788@pusan.ac.kr

· 접수 2013/06/02 · 수정 2013/06/07 · 채택 2013/06/11

직통하여 疎風散寒, 除濕通痺, 活絡止痛의 힘을 발휘한다⁸⁾.

羌活, 獨活에 대한 최근 연구로서 이 등⁹⁾의 강활과 방풍의 배합에 의한 항염작용, 박 등¹⁰⁾의 강활 추출물의 염증성 세포활성에 대한 억제 효과, Nguyen 등¹¹⁾의 독활로부터 분리된 성분에 의한 COX-2 억제 및 PGE2 합성 저해효과를 보고하였으며, 김 등¹²⁾의 가미해동피산의 항류마티스작용, 박 등¹³⁾이 진교·위령선·하고초 복방의 통증억제 효과, 이 등¹⁴⁾은 두충·속단 배합약물의 관절염 치료효과, 김 등¹⁵⁾은 가미대강활탕의 관절염 억제 효과가 있음을 증명하였으나, 두 배합약물의 관절염 치료 효과에 대한 보고가 없는 실정이다.

이에 저자는 강활과 독활 배합의 관절염에 대한 효과를 알아보고자 DBA/101aHsd 생쥐에 Collagen II를 감각시켜 관절염을 유도한 후 강활·독활을 배소한 전탕액을 투여하여 항관절염 효과를 관찰해본 결과, 강활과 독활의 배합약물이 관절염 치료효과에 미치는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 플라스인터내셔널 (England)에서 분양받은 6주령의 암컷 DBA/101aHsd를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 강활 (*Ostericum koreanum*

Maxim.: OS), 독활 (*Aralia continentalis* Kitagawa: AC)는 상지대학교 한방병원에서 구입하여 기원의 진위와 품질의 상태를 상지대학교 본초학 교실에서 검정한 후 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen, acetic acid, complete freund's adjuvant, methotrexate, 생리식염수, heparin, ACK 용액, NH₄Cl, KHCO₃, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, TMB, antibody biotin-conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazole, 5-carboxymethylthioxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichlorodifluorescein diacetate (DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), 7icSigma사 (U.S.A), 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan), 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (Madison, U.S.A) 제품을, IL-4와 IFN-γ는 ELISA kit (Boosource, U.S.A), antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system, U.S.A), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS) icHyclone사 (Logan, U.S.A) 제품을, DMEDic-Gibco사 (Gaithersburg, MD, U.S.A) 제품을, RNase는 Pharmacia 사(Torreyana, U.S.A) 제품을, 인간 제조와 TNF-α와 IL-1β는 R&D system 사 (Minneapolis, U.S.A) 제품을, PE-anti-CD3, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-B220, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b는 Pharmingen 사 (Torreyana, Iraq) 제품을, anti-CD28, anti-CD3는 (Serotec, U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

강활, 독활 각 50g으로 구성된 배합약물(OS+AC) 100g을 증류수 1,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-114, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조 (20.4 g) 한 후, 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. (수율: 4.86%)

2) 류마티스 관절염 생쥐 (collagen-induced arthritis : CIA) 모델

Collagen 유발 관절염 (CIA)은 bovine type II collagen에 0.01mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg를 DBA/10IaHsd 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/10IaHsd 생쥐 5마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) 처리한 양성대조군과 강활·독활 두 배합약물 투여군으로 나누었다.

3) 시료 투여

DBA/10IaHsd 생쥐 5 마리씩을 한 군으로 하여 정상군 (Normal group), 치료제를 처리하지 않은 대조군(Control-CT), 그리고 methotrexate (0.3 mg/kg) 처리군(MTX), 강활·독활 두 배합약물 투여군으로 나누어 booster 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)를 매주 3회 각각 0.1 ml 씩 매일 복강에 주사하였으며, 강활·독활 두 배합약물 (200, 50 mg/kg) 투여군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) Arthritis index (AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/10IaHsd

생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준²⁶⁾에 따라 발병률 (incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도(Table 1)를 1 주일에 1회씩 5주간 기록하였다.

5) Thymus, draining lymph node (DLN), paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 thymus, draining lymph node (DLN), paw joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS+RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (180rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포 수 (absolute number)를 산출하였다.

6) 형광 유세포 분석

DBA/10IaHsd 생쥐에서 thymus, draining lymph node (DLN), paw joint를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 2% FBS+

Table 1. Stage and Symptom of CIA

| 단계 | 유발 정도 |
|----|--|
| 0 | No arthritis |
| 1 | Small degree of arthritis |
| 2 | Light swelling |
| 3 | Medium swelling |
| 4 | Severe swelling |
| 5 | Severe swelling and non-weight-bearing |

RPMI 1640)을 넣고 37 °C shaker (180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD11c, PE-anti-MHC class II 를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 thymus, draining lymph node (DLN), paw joint에서의 절대세포 수 (absolute number)를 산출하였다. PBMC (peripheral blood mononeucleo cell)는 heparin이 들어있는 주사기로 심장 천자법으로 채혈하여 혈장을 분리한 후 혈액세포를 분리하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3g NH₄Cl, 1g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D- PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 측정된 PBMC 세포를 5 x 10⁵/ml 세포로 조정된 후 4°C에서 면역 형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석하였다.

7) 비장세포 내 IL-4, IFN-γ 생성량 측정

실험 종료 후 비장세포 (2 x 10⁶/mL)는 anti-CD28 (1 μg/mL) 항체 (Serotec. U.S.A)와 anti-CD3 (1 μg/mL) (Serotec. U.S.A), 그리고 collagen type II (1 μg /mL)로 96-well Costar 접시 (Corning Inc, Cambridge, Mass. U.S.A)에서 coating 된 plate에서 48시간 동안 동시배양 하였다. 비장 내 IL-4와 IFN-γ는 ELISA kit (R&D system, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 비장세포 배양 상층액 100 μl씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody

biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다.

다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin- HRP conjugated (R&D system, U.S.A) 100 μl를 처리하고, 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 혈청 내 사이토카인 및 rheumatoid factor (RF) 분석

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF-α 그리고 RF인 총 IgM 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μl (1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μl의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

Collagen II 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)로 생산량을 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 μl (1/200 dilution)씩 분주하고, 12 시간 동안 4°C 냉장실에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 30 분간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

10) 병리 조직 검사

약물 투여 4주일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, epoxy에 포맷하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

11) 통계분석

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 unpaired Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

III. 결 과

1. 관절염 유발에 미치는 영향

관절염 유발 후 arthritis index값을 매주 한번 씩 5주 동안 검사한 결과, 약물을 처리한 후 1주 부터 MTX 투여군과 강활·독활 두 배합약물 투

여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

2 조직학적 변화

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, 강활·독활 두 배합약물 (200 mg/kg, 50 mg/kg)를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색과 M-T 염색을 통하여 조직을 분석하였다. Fig. 2의 B는 CIA의 대조군으로 CIA에 의한 관절에 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, subsynovial inflammation 그리고 활막세포의 hyperplasia의 침투가 일어나 연골과 뼈의 침하가 진행되었다. 그 외에도 활막의 파괴, 혈관의 강활·독활 두 배합약물 투여군 (200 mg/kg) (Fig. 2. D), 그리고 강활·독활 두 배합약물 (50 mg/kg) (Fig. 2. E) 투여군에서는 대조군에 현저하게 관찰된 synovial paw joint cavity (JC)에서의 염증을 관찰할 수 없었고, 또한 관절 주변에서도 역시 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

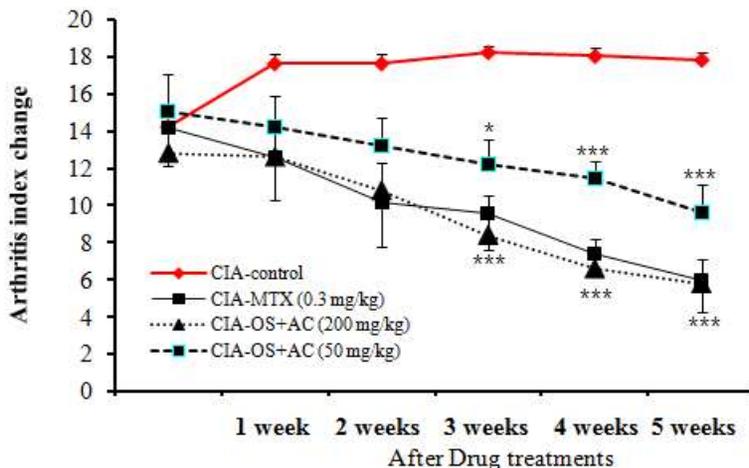


Fig. 1. Suppressive effect of OS plus AC on arthritis index of paw joint in CIA mice. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every six day interval. Following boosterization of collagen mice were divided into four groups and each group was treated with DW (CIA-CT), MTX (CIA-MTX; 0.3 mg/kg) or OS plus AC (CIA-OS+AC; 200 or 50 mg/kg) or in a daily base. Normal mice without injection of collagen and Complete Freund's adjuvant were treated with DW. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

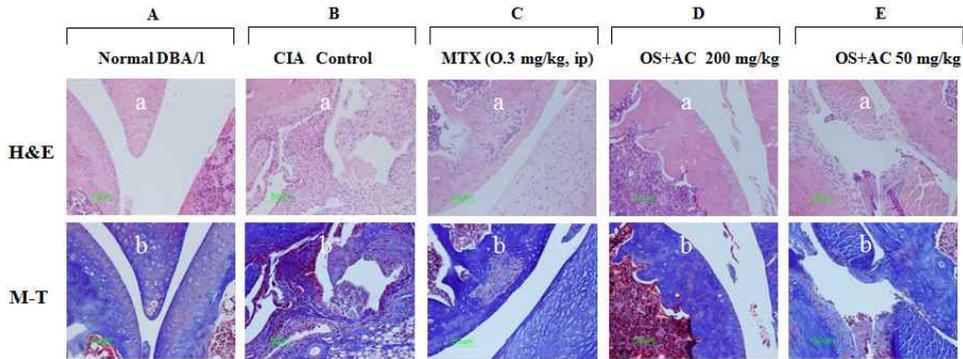


Fig. 2. Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1OlaHsd mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin and Meisson Trichrome staining. Normal wild-type DBA/1OlaHsd mouse (A), control ; murine CIA (B), MTX-0.3 mg/kg (C), OS+AC 200 mg/kg (D), and OS+AC 50 mg/kg (E) were analysis with histopathology of paw joints of murine CIA. Intraarticular exudate, marginalerosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel. Original magnifications: X 200.

3. DLN 및 paw joint의 총 세포 수에 미치는 영향

DBA/1OlaHsd mice에 4주간 강활·독활 두 배합약물을 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 고농도에서 유의성 있게 감소되었으며 (Fig. 3A), Paw joint에서는 정상군이 $7.63 \pm 0.88 (x10^6)$, 대조군이 $17.25 \pm 0.25 (x10^6)$, MTX 투여군이 $8.75 \pm 0.25 (x10^6)$, 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 투여군이 $9.3 \pm 2.7 (x10^6)$, 강활·독활 두 배합약물 50 mg/kg 투여군이 $9.9 \pm 0.9 (x10^6)$ 로 나타나 배합약물 투여군에서 대조군에 비하여

유의성 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) 있게 감소되었다 (Fig. 3B).

4. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)내 면역세포에 미치는 영향

상군이 각각 $46.5 \pm 1.1\%$, $14.6 \pm 0.7\%$ 대조군이 각각 $29.0 \pm 1.75\%$, $9.6 \pm 0.9\%$, MTX 투여군이 $32.0 \pm 0.45\%$, $11.1 \pm 0.6\%$, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 $43.2 \pm 2.2\%$, $11.8 \pm 0.65\%$, 강활·독활 두 배합약물 50 mg/kg 투여군이 $30.4 \pm 0.55\%$, $9.6 \pm 0.25\%$ 로 나타나, 200,

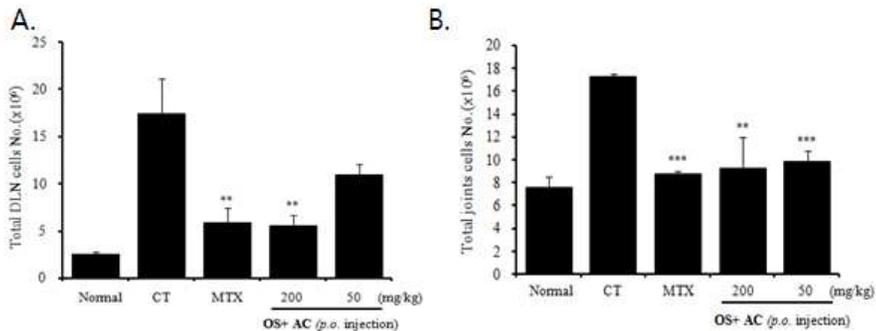


Fig. 3. Effect of OS plus AC on total cell number of DLN and paw joints in CIA mice. Normal, CT (Control), MTX (0.3 mg/kg) OS+AC (200 mg/kg or 50 mg/kg). Statistically significant value compared with CT by T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Normal : Normal DBA/1OlaHsd mouse group. CT : DBA/1OlaHsd mouse group boosted with collagen type II ($1 \mu\text{g/ml}$) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. OS+AC 200 : DBA/1OlaHsd mouse group boosted with collagen type II ($1 \mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (200 mg/kg) once a day for 4 weeks. OS+AC 50 : DBA/1OlaHsd mouse group boosted with collagen type II ($1 \mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (50 mg/kg) once a day for 4 weeks.

50mg/kg에서 대조군에 비하여 CD4⁺는 고농도에서 유의성 있게 증가되었으나, CD8⁺ 세포 비율은 변화가 없었다(Fig. 4A).

CD4⁺/CD25⁺ 세포 수는 정상군이 3.6±1.0%, 대조군이 9.6±0.63%, MTX 투여군이 7.1±0.11%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 4.2±0.97%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 5.8±1.03%로 나타나 대조군에 비해 감소하였다. B220⁺/CD23⁺ 세포 수는 정상군이 1.2±0.6%, 대조군이 20.6±0.95%, MTX 투여군이 15.8±2.41%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 8.9±0.85%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 14.7±2.15%로 나타나 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유의성 (*p<0.05, ***p<0.001) 있게 감소되었다(Fig. 4B).

PBMC 내 granulocytes 세포 수 변화를 측정 한 결과, 정상군이 13.2±2.0%, 대조군이 36.9±0.7%, MTX 투여군이 13.3±0.1%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 20.6±2.0, 강활·독활 두 배합약물 5mg/kg 투여군이 28.9±0.4%로 나타나 강활·독활 두 배합약물 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001) 있게 감소되었다 (Fig. 4C).

5. DLN 내 면역세포에 미치는 영향

CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포 수를 측정한 결과, 정상군이 각각 44.3±1.0%, 22.6±1.4% 대조군이 각각 24.9±2.4%, 14.4±2.7%, MTX 투여군이 34.7±1.25%, 18.9±1.45%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 40.6±1.15%, 21.2±1.3%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 39.0±0.95%, 17.9±3.05%로 나타나, 200, 50mg/kg에서 대조군에 비하여 CD4⁺는 모든 농도에서 유의성 있게 증가되었으며, CD8⁺ 세포는 고농도에서 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5A).

CD4⁺/CD25⁺ 및 CD3⁺/CD69⁺ 세포 수 변화를 측정한 결과, CD4⁺/CD25⁺ 세포 수는 정상군이 7.9±0.2%, 대조군이 5.8±0.5%, MTX 투여군이 2.1±1.68%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 4.6±0.29%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 5.0±0.14%로 나타나 대조군에 비해 감소하였다. CD3⁺/CD69⁺ 세포 수는 정상군이 2.6±0.6%, 대조군이 7.8±0.11%, MTX 투여군이 4.4±0.61%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 4.8±0.55%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 4.8±0.62%로 나타나 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유의성 (***p<0.001) 있게 감소되었다(Fig. 5B).

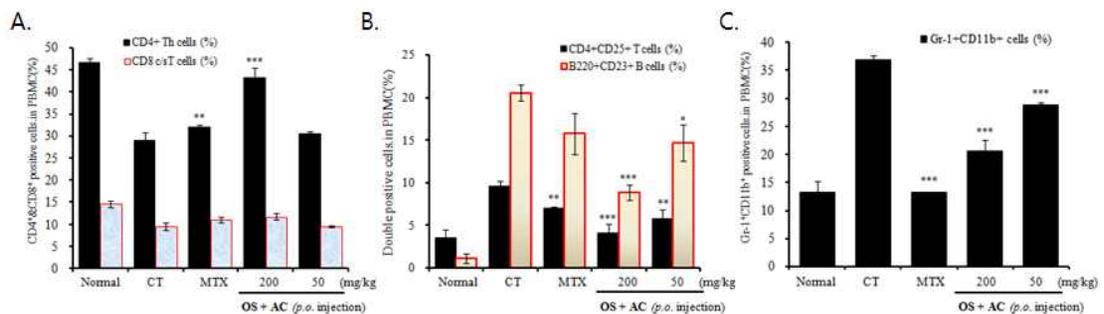


Fig. 4. Effects of OS plus AC on Proportion of CD4+ & CD8+(A), CD4+/CD25+ & B220+/CD23+ (B), and granulocytes (C) in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Collagen Induced Arthritis Mice. Peripheral blood mononuclear cells (106 cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of OS plus AC. The cells were incubated with PE-anti-Gr-1 and FITC-anti-CD11b antibody and analyzed by flow cytometer. CT : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 µg/ml). Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Normal : Normal DBA/10laHsd mouse group. CT : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 µg/ml). MTX : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 µg/ml) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. OS+AC 200 : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 µg/ml) and treated with OS+AC (200 mg/kg) once a day for 4 weeks. OS+AC 50 : DBA/10laHsd mouse group boosted with collagen type II (1 µg/ml) and treated with OS+AC (50 mg/kg) once a day for 4 weeks.

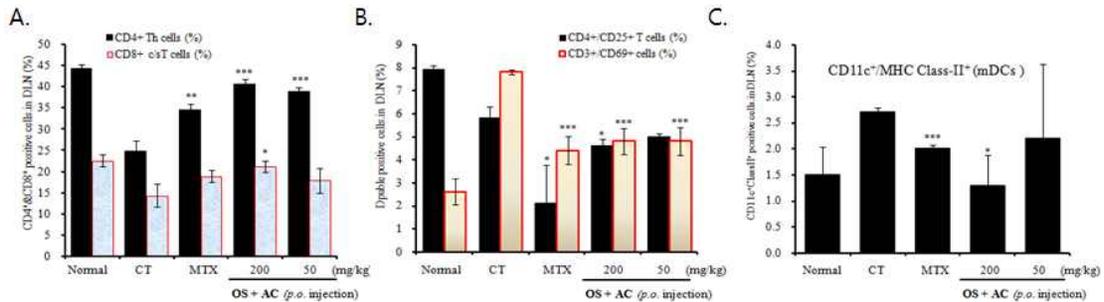


Fig. 5. Effect of OS plus AC extract on the of MHC class II⁺/CD11c⁺ cells in Draining Lymph Node of Collagen Induced Arthritis Mice. Draining lymph nodes were isolated following 4 weeks administration of OS plus AC. The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD11c and PE-conjugated anti-MHC class II analyzed by flow cytometer. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Normal : Normal DBA/10IaHsd mouse group. CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μ g/ml). MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μ g/ml) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. OS+AC 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μ g/ml) and treated with OS+AC (200 mg/kg) once a day for 4 weeks. OS+AC 50 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 μ g/ml) and treated with OS+AC (50 mg/kg) once a day for 4 weeks.

MHC class II⁺/CD11c⁺ (Dendritic cell) 세포 수를 측정 한 결과, 정상군이 1.5±0.5%, 대조군이 2.7±0.08%, MTX 투여군이 2.0±0.08%, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도 투여군이 1.3±0.58%, 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도 투여군이 2.2±1.43%로 나타나, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 5C).

6. 혈청 내 염증성 cytokine 생성량에 미치는 영향

혈청 내 TNF- α 생성량을 분석한 결과, 정상군이 4.1±1.2 (pg/ml), 대조군이 51.0±18.3 (pg/ml), MTX 투여군이 16.8±2.2 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 19.5±4.4 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 31.0±17.3 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 6A).

혈청 내 IL-6 생성량을 분석한 결과, 정상군이 6.9±0.7 (pg/ml), 대조군이 47.0±8.2 (pg/ml), MTX 투여군이 18.5±0.9 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 18.6±10.8 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 27.8±4.1 (pg/ml)이었다. (Fig. 6A).

혈청 내 IFN- γ 생성량을 분석한 결과, 정상군

이 32.1±13.0 (pg/ml), 대조군이 142.1±13.0 (pg/ml), MTX 투여군이 42.1±7.0 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 42.1±5.0 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 86.1±45.0 (pg/ml)이었다 (Fig. 6A).

혈청 내 IgM 농도를 분석한 결과, 정상군이 8.5±0.6 (U/ml), 대조군이 17.6±1.3 (U/ml), MTX 투여군이 10.5±0.6 (U/ml), 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도로 투여한 실험군이 10.7±1.5 (U/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 12.5±1.7 (U/ml)로 나타나 모든 실험군이 대조군에 비해 유의성 (*p<0.05, **p<0.01) 있게 감소되었다 (Fig. 6B).

혈청 내 collagen II 항체량을 측정 분석한 결과, 정상군의 collagen II 항체 발현량은 280.0±20.0 (mU/ml), 대조군의 collagen II 항체 발현량은 9000.0±760.0 (mU/ml), MTX 투여군의 collagen II 항체 발현량은 3920.0±200.0 (mU/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 6420.0±980.0 (mU/ml), 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도로 투여한 실험군이 5280.0±780.0 (mU/ml)로 나타나 두 실험군에서 대조군의 collagen II 항체 발현량에 비해 유의성 (*p<0.05, *p<0.01) 있게 감소되었다 (Fig. 6C).

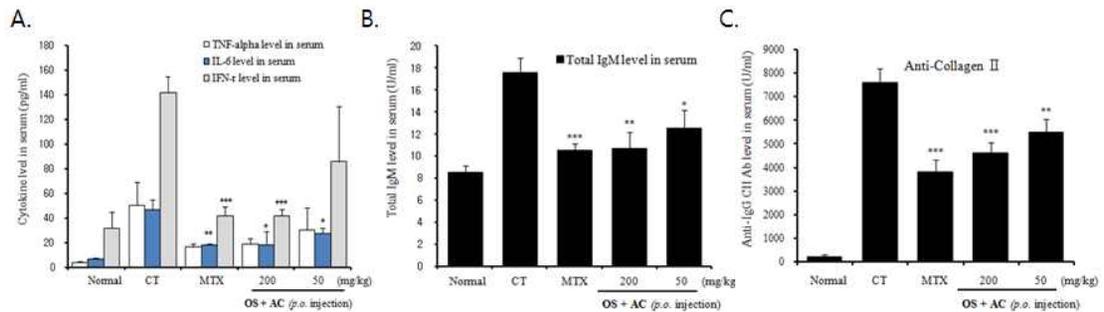


Fig. 6. Effects of OS plus AC on the level of TNF- α , IL-6 and IFN- γ (A), Total IgM (B), Anti-collagen II (C) in the serum in CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of cytokines were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with CIA-CT by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Normal : Normal DBA/10IaHsd mouse group. CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$). MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. OS+AC 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (200 mg/kg) once a day for 4 weeks. OS+AC 50 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (50 mg/kg) once a day for 4 weeks.

7. 비장세포 부유액내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IFN- γ & IL-4 생성량은 CD3/CD28로 활성화된 정상군이 각각 988.1 \pm 451.1 (pg/ml), 356.6 \pm 79.4 (pg/ml), 대조군이 3033.0 \pm 88.0 (pg/ml), 794.0 \pm 244.0 (pg/ml), MTX 투여군이 1320.0 \pm 91.0 (pg/ml), 1470.0 \pm 422.0 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 2179.0 \pm 342.1 (pg/ml),

1409.0 \pm 341.1 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 투여군이 2987.0 \pm 172.0 (pg/ml), 1588.0 \pm 125.0 (pg/ml)로 나타나 고농도에서 IFN- γ 가 대조군에 비하여 유의성 (* $p < 0.05$) 있게 감소되었다(Fig. 7A).

콜라겐으로 활성화된 비장세포의 IFN- γ & IL-4 생성량은 콜라겐으로 활성화된 정상군이 각각 39.1 \pm 4.0 (pg/ml), 5.2 \pm 0.6 (pg/ml), 대조군이 95.1 \pm 6.0 (pg/ml), 9.0 \pm 0.6 (pg/ml), MTX 투여군

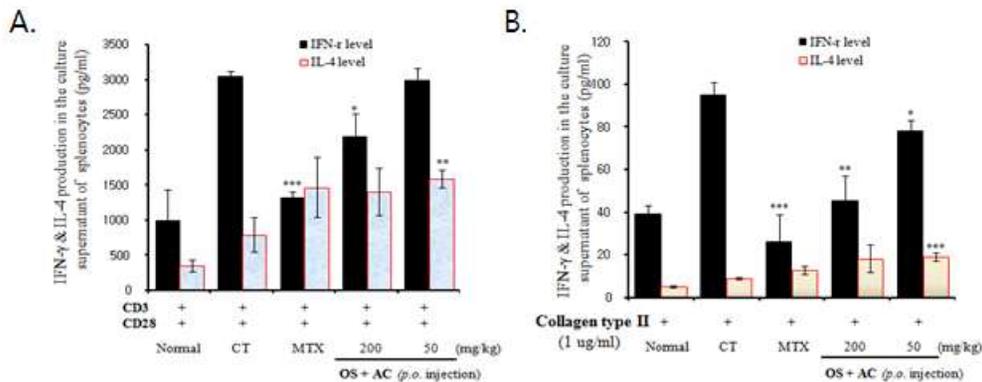


Fig. 7. Effects of OS plus AC on IFN- γ & IL-4 production in the culture supernatant of CD3/CD28-stimulated (A) and Collagene type II-stimulated splenocytes. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and Collagen type II for 2 days and the levels of IFN- γ & IL-4 were in the culture supernatant determined using commercially available ELISA kit. Normal : Normal DBA/10IaHsd mouse group. CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$). MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) two times a week for 4 weeks. OS+AC 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (200 mg/kg) once a day for 4 weeks. OS+AC 50 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with OS+AC (50 mg/kg) once a day for 4 weeks.

이 26.1 ± 13.0 (pg/ml), 12.8 ± 1.9 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군이 45.1 ± 12.0 (pg/ml), 18.4 ± 6.3 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50 mg/kg 투여군이 78.1 ± 5.0 (pg/ml), 19.0 ± 1.9 (pg/ml)로 나타나 모든 농도에서 IFN- γ 가 대조군에 비하여 유의성 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) 있게 감소되었다(Fig. 7B).

IV. 고찰

류마티스 관절염의 원인으로는 면역계의 불균형에 의한 것으로서 T 림프구, 활막세포 (synov-iocytes), 수지상세포 (dendritic cells), B 림프구, 비만세포, 파골세포 (osteoblast) 및 이들 세포에서 생성되는 여러 cytokine의 상호작용에 의하여 관절염이 증가 또는 호전되는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

류마티스 관절염의 치료는 스테로이드와 비스테로이드성 항염제, 부신피질 호르몬제, 항류마티스제, 세포독성제, 생물학적 제제 등 여러 가지 방법으로 이루어지고 있으나 장기간의 사용으로 인한 부작용이 우울증, 위장관의 궤양유발, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 유발하고 있어 안전하고 효과적인 치료 방법이 요구되고 있는 실정이다¹⁷⁾. 따라서 류마티스성 관절염의 진행을 억제하고, 부작용을 줄일 수 있는 효과적인 신물질로서 최근 한약재에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 전통 한약재 중 風濕으로 인한 다양한 腰膝의疼痛과 無力을 다스리는 羌活과 獨活의 배합약재를 응용하여 유의한 결과를 얻었다.

羌活은 上焦에 작용하며 祛風濕에 강하고, 巔頂部로 直上하고, 肢臂로 橫行하여 遊風頭痛, 風濕骨節疼痛 등의 증상을 치료한다. 獨活은 주로 下焦에 작용하여 祛風濕하고 通行氣血하여 伏風頭痛, 腰腿膝足濕痺 등의 증상을 치료한다. 藥對로서 두 약을 配用하면 一上一下로 족태양방광경에 직통하여 疏風散寒, 除濕通痺, 活絡止痛의 힘을 발휘한다⁸⁾. 羌活과 獨活의 配伍는 《外臺

秘要》에서 나왔으며, 각 등분하여 술을 붓고 달인 후 매일 공복에 복용하면 역절풍을 다스릴 수 있다 하였다⁸⁾.

羌活과 獨活에 대한 최근 연구로는 이 등⁹⁾의 강활과 방풍의 배합에 의한 항염작용, 박 등¹⁰⁾의 강활 추출물의 염증성 세포활성에 대한 억제 효과, Nguyen 등¹¹⁾의 독활로부터 분리된 성분에서 COX-2 억제 및 PGE2 합성을 저해효과를 보고하였으며, 김 등¹²⁾이 가미해동피산의 면역조절을 통한 항류마티스작용을 증명하였고, 박 등¹³⁾이 진교·위령선·하초초 복방이 통증억제 효과가 있음을 증명하였고, 이 등¹⁴⁾은 두충·속단 배합약물의 관절염 억제효과를, 김 등¹⁵⁾은 가미대강활탕이 콜라겐II 유발 관절염 모델에서 면역학적으로 효과가 있음을 증명하였으나, 두 배합약물의 관절염 치료 효과에 대한 보고가 없는 실정이다.

본 연구에서 강활·독활 두 배합약물을 투여하여 관절염(Rheumatoid Arthritis : RA)을 심화 혹은 억제시키는 여러 요소들에 대해 아래와 같은 결과를 얻어냈다.

관절염 유발 후 arthritis index값을 매주 한 번씩 5주 동안 검사한 결과, 약물을 처리한 후 3주부터 MTX 투여군과 강활·독활 두 배합약물 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1). 이는 강활·독활 두 배합약물이 RA를 억제시키는 효과가 있음을 의미한다. 그리고 조직학적으로도 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소했다(Fig. 2D, E). DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 고농도에서 유의성 있게 감소하였으며, Paw joint에서는 배합약물 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3B). CIA 생쥐의 PBMC 내에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 수 변화를 측정한 결과, 강활·독활 두 배합약물 고농도 투여군에서 대조군에 비해서 CD4⁺ 세포의 수는 유의성 있게 증가되었으나, CD8⁺ 세포의 비율은 변화가 없었다(Fig. 4A). CD4⁺/CD25⁺ 및 B220⁺/CD23⁺ 세포의 수는 대조군에 비해서 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유

의성 있게 감소되었다(Fig. 4B). Granulocytes 세포 변화를 측정된 결과, 강활·독활 두 배합약물 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4C). Draining lymph node (DLN)에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 비율을 측정된 결과, 200, 50mg/kg에서 대조군에 비하여 CD4⁺는 모든 농도에서 유의성 있게 증가되었으며, CD8⁺ 세포의 비율은 고농도에서 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5A). CD4⁺/CD25⁺ 및 CD3⁺/CD69⁺ 세포의 수는 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 투여군에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율은 큰 변화를 보이지 않았으나, CD3⁺/CD69⁺ 비율은 모든 농도군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5B). DLN에서 MHC class II⁺/CD11c⁺ 세포 변화를 측정된 결과, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5C).

혈청 내 TNF- α 생성량을 분석한 결과, 정상군이 4.1 \pm 1.2 (pg/ml), 대조군이 51.0 \pm 18.3 (pg/ml), MTX 투여군이 16.8 \pm 2.2 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도로 투여한 실험군이 19.5 \pm 4.4 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 31.0 \pm 17.3 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 6A).

혈청 내 IL-6 생성량을 분석한 결과, 정상군이 6.9 \pm 0.7 (pg/ml), 대조군이 47.0 \pm 8.2 (pg/ml), MTX 투여군이 18.5 \pm 0.9 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도로 투여한 실험군이 18.6 \pm 10.8 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 27.8 \pm 4.1 (pg/ml)이었다 (Fig. 6A).

혈청 내 IFN- γ 생성량을 분석한 결과, 정상군이 32.1 \pm 13.0 (pg/ml), 대조군이 142.1 \pm 13.0 (pg/ml), MTX 투여군이 42.1 \pm 7.0 (pg/ml)이었으며, 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군이 42.1 \pm 5.0 (pg/ml), 강활·독활 두 배합약물 50mg/kg 농도로 투여한 실험군이 86.1 \pm 45.0 (pg/ml)이었다 (Fig. 6A)

혈청 내 IgM 농도를 분석한 결과, IgM 발현량이 대조군의 IgM 발현량에 비해 유의성 있게 감

소되었다 (Fig. 6B).

혈청 내 collagen II 항체량을 측정 분석한 결과, 강활·독활 두 배합약물을 투여한 실험군이 대조군의 collagen II 항체 발현량에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 6C).

CD3/CD28로 활성화된 비장세포의 IFN- γ & IL-4 생성량은 고농도 투여군에서 IFN- γ 가 감소되었으며, 모든 농도에서 IL-4의 생성량이 증가되었다(Fig. 7A). 콜라겐으로 활성화된 비장세포의 IFN- γ & IL-4 생성량은 모든 농도에서 IFN- γ 가 유의성 있게 감소되었으며, 50mg/kg 농도 투여군에서 IL-4 생성량이 유의성 있게 증가되었다(Fig. 7B).

최근 연구보고에 의하면 CD19⁺ B 세포 또한 관절염의 병리기전에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며¹⁸⁾, 특히 type II collagen 에 의해 유도된 관절 모델에서 B 세포가 제거된 경우에는 관절염이 발생되지 않는 것으로 보고되었는데¹⁹⁾, B220⁺/CD23⁺ B 세포가 DLN 내에서는 유의성 있는 변화가 없었으나, PBMC 및 Paw joint 내에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

CD69⁺는 말초 림프기관의 T세포와 B세포의 작은 아집단으로, 림프세포에 표현되고 림프세포에 의해 활성화되는 초기활성항원이다²⁰⁻²²⁾. 그 외 CD69⁺는 다양한 만성염증질환의 림프세포 침윤에서 나타난다²³⁾.

CD4⁺/CD25⁺는 구조적으로 IL-2 리셉터 사슬인 CD25로 표현되는 CD4⁺T세포 집단은 자가면역 질환의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 기능적인 분석에 있어서, 자연조절 T세포라고 불리는 흉선에서 분비된 CD4⁺, CD25⁺ T세포들은 polyclonal(다클론) 혹은 항원특이적 자극에 반응하여 싸이토카인을 분비하거나 증식하지는 못하지만 그대신 전통적인 반응세포들의 활성을 억제한다²⁴⁾. CD25⁺세포들의 제거는 DBA/1 mice의 자연발생적인 관절염을 이끌어 내는 것으로 나타났다²⁵⁾. CD25⁺ cell 제거는 DBA/1 mice의 CIA의 심한 정도를 높이고, 발생을 촉진하는 것으로 나타났다. CD25⁺ 세포가 제거되고 CII-면역된 DBA/1 mice의 비장세포에서 CII특이적인 침윤이 증

가하는 것이 보인다²⁶⁾. 그러므로 CD4+, CD25+ 조절 T 세포들은 C II에서 자가면역을 형성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 강활·독활 두 배합약물을 투여했을 때, DLN 내에서 CD3+/CD69+ 세포 수가 유의성 있게 감소되었으며, CD4+/CD25+ 세포 수는 PBMC 와 DLN 내에서는 유의성 있게 감소되었다.

최근 연구보고에 의하면, 관절염 군의 PBMC내 regulatory T 세포 수가 증가되거나 감소되는 상반되는 결과가 보고되었다^{27,28)}. CD4+CD25+ 세포 중에는 오직 CD4+CD25(high)인 세포가 억제 효과를 갖는 regulatory T 세포이며, CD25+인 세포 중에 상수는 effector T 세포가 포함된 것이다.

그러나 CD4+CD25+ T 세포가 감소하였다고 하여 반드시 Regulatory T 세포가 감소하였다고는 볼 수 없는데. 이는 regulatory T 세포가 되기 위한 CD62L이나, CD152, 그리고 Foxp3 유전자가 증가가 있었는지를 관찰하여 effector T 세포와 regulatory T 세포인지를 구별해야 한다. 따라서 강활·독활 두 배합약물이 regulatory T 세포를 조절하여 관절염이 치료된다고 한다면 위와 같이 좀 더 추가적인 연구가 진행되어야 될 것이다.

RA의 유발 및 관절 파괴에 있어서 T 세포 중 IFN- γ 생산이 우세한 상태로 CD4+ Th1 세포와 대식세포는 만성 RA에서 활막의 파괴 및 침윤, 그리고 질환의 진행에 주도적 역할을 담당한다²⁹⁾. CD4+ T 세포와는 달리 CD8+ T 세포는 CIA의 병리에서 억제 역할을 하는 것으로 보고되어³⁰⁾. 이들 세포는 관절염 억제와 진행에 중요한 역할을 담당하며, 그 양상이 조직이나 위치에 따라 달리 기능을 갖는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 강활·독활 두 배합약물을 투여했을 때, PBMC 에서는 강활·독활 두 배합약물 200 mg/kg 투여군에서 CD4+ 세포 수가 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고, DLN 내에서도 유의성 있게 증가되었다. CD8+ T 세포는 PBMC에서는 유의성 있는 변화가 없었으나, DLN 내에는 고농도에서 유의성 있게 증가되었다.

RA는 MHC HLA class II 항원과의 연관성이 가장 크며, HLA class II의 주된 기능은 CD4+ T 세

포에 항원을 인지시키고, 활성화된 CD4+ T 세포는 monocytes, macrophages, synovial fibroblasts 를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 생산하고, 조직을 파괴하는 matrix metalloprotease(MMP)를 분비하며, IL-1, IL-6, TNF- α 는 RA에서 염증을 유도하는 중요한 cytokine이다³²⁾. RA에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막의 연접부의 침식에 의해 발생한다. DLN에서 MHC class II+/CD11c+ (Dendritic cell) 세포 수를 측정 한 결과, 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 6C).

관절염 염증 부위에는 CD11b+Gr-1+(과립구세포)세포의 침윤이 많이 일어나는 것으로 알려져 있다³³⁾. 강활·독활 두 배합약물 200, 50mg/kg 농도로 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 CD11b+Gr-1+(과립구세포)세포의 총세포수가 유의성 있게 감소를 나타내었다(Data not shown).

RA는 만성 염증성 질환으로 관절내의 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 초기 및 진행 단계에 이들 염증성 사이토카인과 함께 CD4+ T 림프구 등의 면역세포들이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

이는 특히 Th1과 Th2 사이토카인의 balance가 깨지면서 Th1-편향의 사이토카인이 상대적으로 과잉 생성돼 나타나는 질환으로 알려져 있다^{35,36)}. 염증반응을 널리 전하는 cytokine의 생산에 반하여 이들 cytokine의 활동을 저해하는 특이억제물질(inhibitor)이 생산되며, T세포 활성화와 증식, B세포 분화와 염증부위로의 이동등과 같은 특징적인 류마티스 염증반응을 억제하는 cytokines의 생산 등 염증을 느리게 하는 국소인자들이 분비된다. 강활·독활 두 배합약물 200mg/kg 농도로 투여한 CIA 생쥐에서 혈청내 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IFN- γ 의 분비가 감소되었으며, 특히 IL-6 및 IFN- γ 가 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 6A).

또한, 강활·독활 두 배합약물을 투여하였을 때 RA 인자인 IgM 생산이 감소하였으며(Fig. 6B),

혈청 내 collagen II 항체량도 감소하였다(Fig. 6C).

CD3/CD28과 콜라젠으로 활성화된 비장세포의 IFN- γ 량은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

이상의 결과로 보아, 강활·독활 두 배합약물이 항류마티스 효능을 가지는 면역조절물질 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

V. 결 론

Type II Collagen으로 유도된 관절염에 대한 강활·독활 두 배합약물의 억제 효과를 실험적으로 검색하고자, DBA/1 생쥐에서의 콜라젠으로 관절염을 유발하여, 관절염 발생률, 관절 조직 변화, 관절 조직에서의 면역학적 변화, 혈청 내 rheumatoid factor 농도 및 spleen, draining lymph node (DLN), PBMC에서의 면역 세포 변화 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강활·독활 두 배합약물은 200mg/kg 및 50mg/kg의 용량에서 콜라젠으로 유발된 관절염의 발생 (arthritis index)을 유의적으로 억제하였다.
2. 강활·독활 두 배합약물은 관절염이 발생한 조직에서 염증 세포의 유입과 연골의 파괴를 유의적으로 감소시켰다.
3. Paw joint, 및 DLN에서 총 세포 수를 현저하게 감소시켰다.
4. 강활·독활 두 배합약물은 PBMC에서는 B220⁺/CD23⁺, granulocytes 세포 수는 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰으며, DLN에서는 CD3⁺/CD69⁺세포 및 MHC class II⁺/CD11c⁺ (Dendritic cell) 세포 수를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 강활·독활 두 배합약물의 200 mg/kg 농도에서 염증성 사이토카인 IL-6, IFN- γ 의 생성을 현저하게 감소시켰다.
6. 강활·독활 두 배합약물은 류마티스 관절염 요소의 일종인 IgM을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 강활·독활 두 배합약물은 류마티스 관절염에서 효과가 기대되며, 임상에서 류마티스 관절염에 쓸 각 처방에 이 약물을 배합할 시에는 효과가 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903-11.
2. Wolfe T, Mitchell DM, Siley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinhksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:481-94.
3. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:429-42.
4. Smolen JS, Alethaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. Rheumatoid therapies for treatment of rheumatoid arthritis *Lancet* 2007; 370:1861-74.
5. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synovocytes in rheumatoid arthritis: passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996;39:1781-90.
6. 전국한의과대학공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2007:159-161, 303-304.
7. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2002:319-322.
8. 이승혁. 임상약대론. 서울:의성당. 2008:299.
9. 이도연, 최고야, 윤태숙, 전명숙, 김승주, 야스카와 켄, 유소연, 김호경. 강활과 방풍의 항염증 상승작용에 관한 연구. *대한본초학회지.* 2008;23:39-44.
10. 박희제, 배기상, 김도윤, 서상완, 박경배, 김병진, 송제문, 이경용, 나철, 신병철, 박성주, 송호준, 황성연. LPS로 자극한 RAW264.7세포에서 강활 추출물의 염증성세포활성물질의 억제효과. *대한본초학회지.* 2008;23:127-34.
11. Dang NH, Zhang X, Zheng M, Son KH, Chang H W, Kim HP, Bae K, Kang SS. Inhibitory Constituents against Cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. *Arch Pharm Res.* 2005;



- 28:28-33.
12. 김남옥, Collagen II로 유도된 CIA 관절염 생쥐에 대한 가미해동피산의 억제효과. 동의생리병리학회지. 2007;21:1233-42.
 13. 박원태, 정수현, 서일복, 김순중. 진교·위령선·하초 복합방이 MIA 유발 골관절염 모델에서 중추신경내 통증관련물질에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21:1483-90.
 14. 이부균. Collagen II-induced Arthritis 생쥐에 대한 杜冲, 續斷 배합약물의 관절염 억제 효과. 상지대 대학원, 2008
 15. 김태영, 가미대강활탕이 콜라겐II로 유발된 생쥐 모델에 미치는 면역적 연구. 대전대 대학원, 2009.
 16. Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005;12:183-9.
 17. 김무진, 윤종화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 슬관절염의 침구 치료에 관한 문헌 고찰. 대한침구학회지. 2005;22:191-201.
 18. Deng GM, Lenardo M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drug discovery Today: Disease Mechanisms*. 2006;3:163-8.
 19. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*. 1998;111:521-6.
 20. Hara T, Jung LK, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide linked early activation antigen (EA 1) by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med*. 1986;164:1988-2005.
 21. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. T-triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med*. 1988;168:1621-37.
 22. Testi R, Phillips JH, Lanier LL. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol*. 1989; 142:1854-60.
 23. Laffón A, García-Vicuña R, Humberia A, Postigo AA, Corbí AL, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1991;88:546-52.
 24. Fehérvári Z, Sakaguchi S. A paragon of self-tolerance: CD25+ CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:19-25.
 25. Loughry A, Fairchild S, Athanasou N, Edwards J, Hall FC. Inflammatory arthritis and dermatitis in thymectomized, CD25+ celldepleted adult mice. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44:299-308.
 26. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1452-60.
 27. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, Boylston AW, Emery P, Ponchel F, Isaacs JD. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25 high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:1210-7.
 28. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2775-85.
 29. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward

- T lymphocytes with a T helper 1 cytokine–secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1961–9.
30. Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4+ T cells from collagen–induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol.* 1994;97:212–8.
 31. Williams RO, Whyte A, Waldmann H. Resistance to collagen induced arthritis in DBA/1 mice by intraperitoneal administration of soluble type II collagen involves both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Autoimmunity.* 1989;4: 237–45.
 32. Bradley DS, Nabozny GH, Cheng S, Zhou P, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. HLA–DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen–induced arthritis in transgenic mice: implications in human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1997; 100:2227–34.
 33. Gonzalez–Rey E, Chorny A, Varela N, O'Valle F, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin on collagen–induced arthritis by down–regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 2007;56:531–43.
 34. Brahn E, Peacock DJ, Banquerigo ML, Liu DY. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF– α) on collagen arthritis. *Lymphokine Cytokine Res.* 1992;11:253–6.
 35. Furuzawa–Carballeda J, Vargas–Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev.* 2007 ;6:169–75.
 36. D'Elios M, Del Prete G. Th1/Th2 Balance in Human Disease. *Transplant Proc.* 1998;30 :2373–7.