

# 加味防己黃芪湯 주정 추출물이 류마티스 관절염 동물병태모델에 미치는 영향

심부용<sup>1,2#</sup>, 최학주<sup>2</sup>, 박지원<sup>1,2</sup>, 김동희<sup>1,2\*</sup>

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학과, 2 : 대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학연구소

## Effects of GamiBangkeehwangkee-tang (fángjǐhuángqí-tāng) ethanol extract on Collagen-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice

Boo-Yong Sim<sup>1,2#</sup>, Hak-Joo Choi<sup>2</sup>, Ji-Won Bak<sup>1,2</sup>, Dong-Hee Kim<sup>1,2\*</sup>

1 : Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,  
2 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study is to prove the effect of GamiBangkeehwangkee-tang (fángjǐhuángqí-tāng, BHT) ethanol extract on the immunity and rheumatoid arthritis related inflammatory cytokines.

**Methods** : We checked viability in RAW 264.7 cell after treat by BHT. Then we measured inflammatory and immunity factors of DBA/1 mice with rheumatoid arthritis induced by collagen after BHT oral administration. Also, we checked micro-CT image, bone volume and bone inflammation ratio in micro-CT and structural parameter test.

**Results** : BHT showed cell viability of 95% or higher in all concentration in RAW 264.7 cells. BHT treated group decreased level in serum of IgM and IgG test by 36% and 25% respectively. And BHT treated group showed significant decrease in WBC, neutrophil, lymphocyte and monocytes immune cell ratio in blood by 47%, 22%, 56% and 85% respectively. Also, BHT treated group decreased level in serum of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  and hs-CRP tests by 29%, 33%, 32%, 24% and 56% respectively. Finally, BHT treated group showed increase ratio of bone volume that decrease ratio of bone inflammation.

**Conclusions** : In this study, the results were observed rheumatoid arthritis factors cytokine decrease in serum. And BHT showed immunoglobulin and immune cells ratio decrease in serum and blood. Also, BHT depending on effects of inflammatory and immunity in hs-CRP test, micro-CT, structural parameter test. Thus, these results can used as a effective drug of BHT for inflammation and immunity.

**Key words** : cytokine, GamiBangkeehwangkee-tang, inflammation, immunity, rheumatoid arthritis

## 서론

인체에서 염증과 면역반응은 다양한 염증세포와 면역세포를 이용하여 외부의 세균과 바이러스 같은 해로운 물질로부터 우리 몸을 보호하는 매우 중요한 생체현상으로, 염증반응과 면역반응이 과다하게 일어나는 경우에는 염증성 자가면역 질환이 발생하여 결국 사망에 이르게 되며<sup>1-3)</sup>, 천식, 아토피 피부염, 크론병 및 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis, RA) 등이 대표적인 염증성 자가 면역질환으로 알려져 있다.

RA는 손가락, 손목, 발목을 포함한 다양한 관절에서 발생하는데 관절을 둘러싸고 있는 활액막에서 일어나는 염증성 면역 반응으로 인해 전신성 만성 염증 반응으로 진행되며 부종과 통증을 일으키고 결국 관절 조직과 골조직의 침식 및 파괴를 일으킨다<sup>4,5)</sup>. 이러한 RA의 원인은 유전적인 요소를 포함하여 자가면역관용(self tolerance)의 불균형 및 미생물이나 바이러스에 의한 감염 등과 같은 염증 원인과 관련된 여러 환경적 요소들이 복합적으로 관련되어 나타난다<sup>6)</sup>. 따라서 RA는 염증과 면역 기전의 치료가 병행되어야 하는 질병 중 하나이다.

\*Corresponding author : Dong Hee Kim, Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University  
· Tel : +82-42-280-2623 · FAX : +82-42-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : Boo-Yong Sim, Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University  
· Tel : +82-42-280-2828 · FAX : +82-42-280-2624 · E-mail : boyish3@naver.com  
· Received : 16 October 2014 · Revised : 12 November 2014 · Accepted : 12 November 2014

현재 류마티스 관절염 치료제로 아스피린, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬, 질환 변형 약제 (DMARD : disease modifying anti rheumatic drug), 항TNF- $\alpha$ 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다<sup>7,8)</sup>. 그러나 이러한 치료제들은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 다양한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안전성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다<sup>9)</sup>.

防己黃芪湯은 漢代 張의 《金匱要略》<sup>10)</sup>에 최초로 기록된 처방으로 補脾, 利濕의 효능으로 風濕, 脈浮, 身重, 汗出, 惡風 증상에 활용되며, 임상에서는 비만, 관절염 등에 활용되고 있다. 실험적 연구로 김<sup>11)</sup> 등은 고지혈증이 유발된 흰쥐에 미치는 영향을, 김<sup>12)</sup> 등은 생쥐의 비만관련 장내분비세포와 신경 펩타이드에 미치는 영향을, 김<sup>13)</sup> 등은 家兔의 신장기능에 미치는 영향을 각각 보고하였다. 관절염에 대한 연구로 김<sup>14)</sup> 등은 방기황기탕이 Monosodium Indoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향을 연구를 보고함으로써 항관절염 효능을 규명한 바가 있다. 이에 저자는 김<sup>14)</sup>의 실험결과에 준하여 보다 유의적인 항관절염 처방 개발을 위하여 임상에서 鎮痛, 消炎, 利關節 작용이 있는 牛膝, 威靈仙, 川烏頭를 가미한 加味防己黃芪湯을 주정으로 추출 한 후 항RA 효능을 규명하고자 함과 동시에 안전하고 효과적인 RA 치료제의 개발을 하고자 하였다. 실험은 CIA를 통해 RA를 유발시킨 동물 병태 모델을 이용하여 항염증 및 면역학적 효능을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 약재

본 실험에 사용한 加味防己黃芪湯 (GamiBangkeehwangkee-tang 이하, BHT로 표기)의 구성 약재들은 (주)온니허브에서 구입 하였고, 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용 하였으며, 그 내용과 분량 (1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The prescription of BHT

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight (g)
黃 芪	Astragali Radix	14
防 己	Sinomenii Caulis et Rhizoma	12
川烏頭	Aconiti Tuber	12
牛 膝	Achyranthis Radix	12
威靈仙	Clematidis Radix	9
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	9
乾 薑	Zingiberis Rhizoma	9
大 棗	Zizyphi Fructus	9
甘 草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	4
Total amount		90

### 2. 동물 및 사료

실험동물인 수컷 5주령의 DBA/1 mouse (20~23 g)는 (주)중앙실험동물 (Korea)에서 공급 받아 실험 당일까지 고형 사료 (주)퓨리나와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환

경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험 윤리 위원회의 승인 (동물사용 윤리위원회 승인 번호-DJUARB 2014-014)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험하였다.

### 3. 시약 및 기기

사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Mouse IL-17AF ELISA Kit (eBioscience CO., U.S.A.), Mouse IgM ELISA Kit (eBioscience CO., USA), Mouse IgG ELISA Kit (eBioscience CO., U.S.A.), HNO<sub>3</sub>(Duksan, Korea), As, Pb, Hg, Cd standard solution(SCP Science, Canada)를 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), ICP(Shimadzu, Co., Japan), 수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.), HPLC(Shimadzu, Co., Japan) 등을 사용하였다.

### 4. 시료 추출

BHT 1첩 (90 g)에 80% 주정 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 1000 ml을 넣고 100°C에서 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 4.6 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

### 5. HPLC pattern 분석

BHT 추출물 30 mg을 DW 1 ml에 녹여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과 후 10  $\mu$ l를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 system controller, pump, column oven, diode array detector를 사용하였으며, column은 ACE 5 C18 (250 × 4.6 mm)을 사용하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)로 gradient elution system을 적용시켜 0~5분 (0% B), 5~40분 (30% B), 40~60분 (80% B), 60~75분 (100% B)로 설정하였다. 유속은 1.0 ml/min이었으며 column 온도는 40°C를 유지하였고, UV wavelength는 254 nm로 설정하여 분석하였다.

### 6. 중금속 검사

납, 비소, 카드뮴 분석의 경우 BHT 주정 추출물 0.5 g을 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣고 질산 10 ml을 넣은 후, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생 가스를 제거하고 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 다음 분해액을 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물을

넣어 적절하게 표준액의 농도범위로 희석하여 검액으로 하였다. 따로 질산 10 mL를 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합 플라즈마분광계 (ICP)를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 BHT 주정 추출물 50 mg을 정확하게 달아 특별한 전처리 과정 없이 수은분석기를 이용하여 측정하였다.

### 7. 류마티스 관절염 유발 및 BHT투여

2 mg/mL 농도의 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA)와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 혼합액 0.1 mL (제2형 콜라겐 100µg)을 꼬리의 기저부에서 1.5~3 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입하여 1차 유발을 하였다. 1차 유발 후 2주 후에 1차 시기와 동일하게 CFA 대신 incomplete Freund's adjuvant (IFA)과 혼합하여 한쪽 발바닥에 주사하여 관절의 파괴, 변형 및 부종 등을 유발하였다. 실험은 4개의 군으로 나누었으며 매일 1회, 오후 2시에 정상군, 대조군에는 증류수를, 양성대조군인 indomethacin (이하, Indo) 투여군과 BHT 투여군은 각각 200 µl (200 mg/kg) 씩 투여하였다. 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다.

### 8. 간 독성 및 신 독성 검사

혈청 내 AST, ALT, Creatinine, BUN 측정 활성도를 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 서울의과학연구소 (Korea)에 분석 의뢰 하였다.

### 9. 혈청 면역글로블린 측정

실험 종료 후 ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 가지고 면역 글로블린 IgM과 IgG 생성량 측정을 ELISA kit를 이용하여 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 10. 면역세포 및 hs-CRP 측정

혈액 내 면역세포 측정과 고감도 C 반응성 단백검사법 hs-CRP (high-sensitivity C-reactive Protein) 검사는 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 면역세포 측정을 위한 전혈과 hs-CRP 검사를 위한 혈청을 서울의과학연구소 (Korea)에 분석 의뢰 하였다.

### 11. 혈청 cytokine 측정

실험 종료 후 ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 이용하여 채혈한 다음 6,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 가지고 IL-1β, IL-6,

TNF-α는 custom-made 6-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 Luminex로 측정하였으며, IL-17은 ELISA kit를 이용하여 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 12. Micro-CT 및 골밀도, 관절 염증 측정

5주간 실험 종료 후 동물을 희생하여 각 그룹별로 후족부를 분리하였다. 분리한 후족부의 시편을 사후 경직이 일어나기 전 최대한 발가락을 편 후, 10% 포르말데히드 용액에 고정한 뒤 (주)라온바이오 (Korea)에 Micro-CT 촬영 및 Structural Parameter를 의뢰하였다. Micro-CT 촬영은 후족부 전체를 촬영한 후 3D 작업을 실시하였으며, Structural Parameter 측정은 가운데 발가락을 기준으로 BV (bone volume)와 BS (bone surface)에 대한 ratio를 산출하여 골밀도 검사 및 관절의 염증 정도를 나타내었다.

### 13. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. HPLC pattern 분석

BHT 추출물을 HPLC pattern 분석 결과, 254 nm에서 retention time이 9.00분, 15.96분, 18.80분, 33.87분, 42.45분대에 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

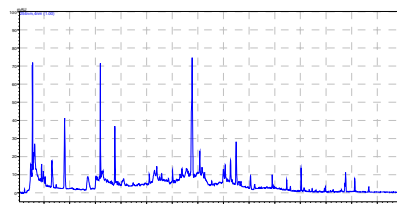


Fig. 1. HPLC chromatogram of 80% ethanol extract of BHT. Column; ACE 5 C18(250 × 4.6 mm), sample injection volume; 10 µl, mobile phase; H2O(A)/ACN(B) gradient elution : 0~5min(0% B), 5~40min(30% B), 40~60min(80% B), 60~75min(100% B), flow rate; 1.0 mL/min, detector; PDA detector.

### 2. 중금속 검사

BHT 추출물의 중금속 함량을 측정한 결과, 카드뮴의 경우 기준치 이하로 검출되었고 나머지 중금속의 경우 검출되지 않았다(Table 2).

Table 2. Content of Pb, As, Cd and Hg in 80% ethanol extract of BHT

	Pb	As	Cd	Hg
allowable concentration (mg/kg)	5	3	0.3	0.2
BHT	N.D. <sup>1)</sup>	N.D.	0.002	N.D.

<sup>1)</sup> N.D. : Not detected.

### 3. 간 및 신 독성에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 AST (Aspartate aminotransferase)는 정상군이 125.4±6.4 (U/L), BHT 투여군이 133.8±6.3 (U/L)로 나타났으며, ALT (Alanine aminotransferase)는 정상군이 46.7±3.3 (U/L), BHT 투여군이 47.2±6.7 (U/L)로 나타나, 정상군과 큰 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다. 또한, 신 기능 측정의 지표 성분인 creatinine 농도를 측정한 결과, 정상군은 1.6±0.3 (mg/dl), BHT 투여군은 1.4±0.7 (mg/dl)으로 나타났으며, BUN (Blood urea nitrogen) 농도는 정상군이 50.0±2.1 (mg/dl), BHT 투여군이 43.3±3.9 (mg/dl)로 나타나, 정상군과 큰 차이를 나타내지 않아 안전한 것으로 나타났다(Fig. 2).

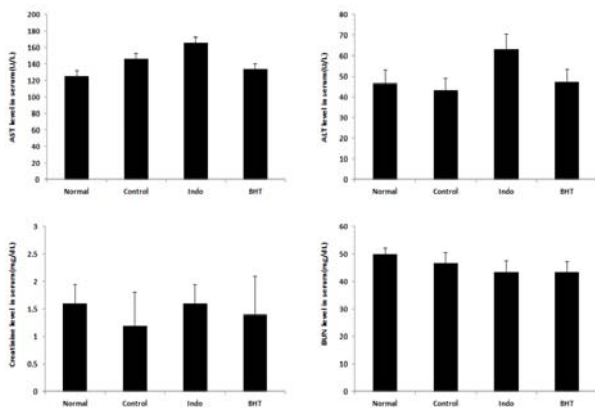


Fig. 2. Effects of BHT on the level of AST, ALT, Cr and BUN in serum from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean±S.D.

### 4. 혈청 내 면역글로불린에 미치는 영향

BHT 투여 종료 후 혈청 내 면역글로불린을 측정한 결과, IgM은 대조군이 49.7±9.3 pg/ml을 나타낸 반면, BHT 투여군은 31.8±5.4 pg/ml로 나타났으며, IgG는 대조군이 127.3±10.5 pg/ml을 나타낸 반면, BHT 투여군이 95.7±8.9 pg/ml로 나타나, IgM과 IgG 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3).

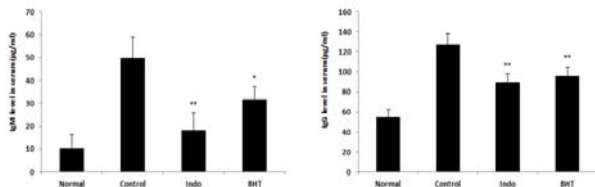


Fig. 3. The level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  mRNA in spleen from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean±S.D.(Significance of results, \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ ).

### 5. 혈액 내 면역세포에 미치는 영향

BHT 투여 종료 후 혈액 내 면역세포를 측정한 결과, 백혈구는 대조군이 5.9±0.4 Thous/uL을 나타낸 반면, BHT 투여군은 3.1±0.5 Thous/uL로 나타났으며, 혈액 내 백혈구에

대한 호중구의 비율은 대조군이 8.2±2.3%을 나타낸 반면, BHT 투여군은 6.4±0.8%로 나타났다. 또한, 백혈구에 대한 림프구의 비율은 대조군이 3.9±0.1%로 나타난 반면, BHT 투여군은 1.7±0.6%로 나타났으며, 백혈구에 대한 단핵구의 비율은 대조군이 0.7±0.1%로 나타난 반면, BHT 투여군은 0.1±0.1%로 나타나, 백혈구와 단핵구에서 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*) :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 4).

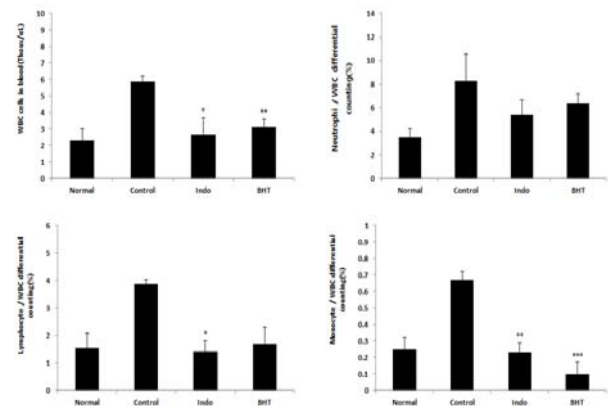


Fig. 4. Effects of BHT on the level of WBC, neutrophil, lymphocyte and monocyte in blood from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean±S.D.(Significance of results, \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ )

### 6. 혈청 내 cytokine에 미치는 영향

BHT 투여 종료 후 혈청 내 cytokine을 측정한 결과, IL-1 $\beta$ 는 대조군이 755.0±68.4 pg/ml을 나타낸 반면, BHT는 533.8±50.9 pg/ml 으로 유의성 있게 (\*\* :  $p < 0.01$ ) 감소하였으며, IL-6는 대조군이 675.9±107.5 pg/ml을 나타낸 반면, BHT는 375.3±90.1 pg/ml으로 유의성 있게 (\*\* :  $p < 0.01$ ) 감소하였다. IL-17은 대조군이 13.4±1.3 pg/ml을 나타낸 반면, BHT는 10.2±0.4 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 감소하였으며, TNF- $\alpha$ 는 대조군이 274.4±37.2 pg/ml을 나타낸 반면, BHT는 186.0±30.8 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게 (\* :  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 5).

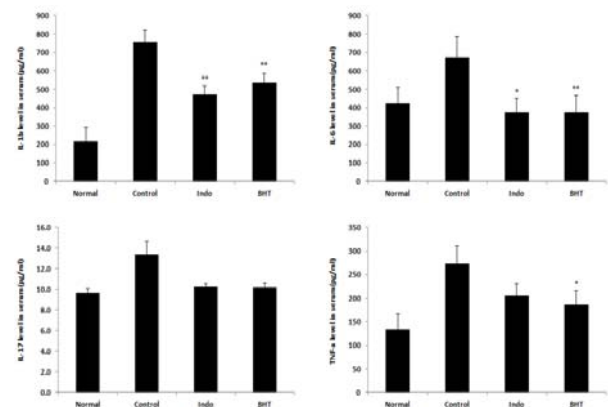


Fig. 5. Effect of BHT on the level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  in serum from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed as mean ± S.D.(Significance of results, \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ ).

### 7. 혈액 내 hs-CRP 검사

BHT 투여 종료 후에 혈액 내 hs-CRP 검사를 실시한 결과, 대조군이  $0.9 \pm 0.1$  mg/L에 비하여 BHT 투여군은  $0.3 \pm 0.1$  mg/L로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게 (\*\* :  $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 6).

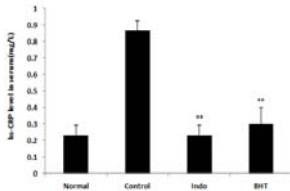


Fig. 6. Effects of BHT on the level of hs-CRP in serum from CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were represent the mean±S.D(Significance of results, \*\* :  $p < 0.01$ ).

### 8. Micro-CT 검사에 의한 형태학적 변화

후족부의 Micro-CT 촬영 결과, 대조군은 중족지 관절과 근위지 관절의 변형과 마디사이의 파괴가 크게 일어난 반면, BHT 투여군은 Indo 투여군과 더불어 상대적으로 중족지관절과 근위지 관절의 변형이 적고 마디사이의 파괴 역시 적게 나타났다(Fig. 7A, B, C, D)

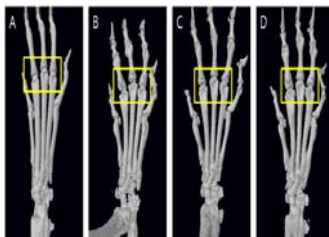


Fig. 7. Micro-CT images of hind paws of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice.

- A: Normal group
- B: Collagen - induced group
- C: Collagen + indomethacin treatment group
- D: Collagen + BHT 200 mg/kg treatment group

### 9. 골밀도 및 관절의 염증에 미치는 영향

Structural Parameter을 통해 골밀도 및 관절의 염증정도를 확인한 결과, 골밀도는 대조군이  $0.21 \pm 0.05$  ( $\times U^3$ )로 나타난 반면, BHT 투여군은  $0.38 \pm 0.06$  ( $\times U^3$ )로 나타나 대조군에 비해 골밀도가 높게 나타났다.

관절의 염증 정도는 대조군이  $26.9 \pm 4.70$  ( $\times 1/U$ )로 나타난 반면, BHT 투여군은  $17.6 \pm 0.33$  ( $\times 1/U$ )로 유의성 있게 (\*  $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 8).

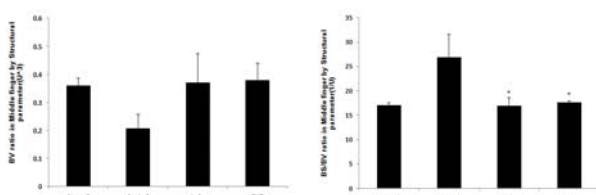


Fig. 8. Effects of BHT that reduced BS (bone surface) and BS (bone surface) / BV (bone volume) ratio using 3D Micro-CT of CIA-induced Rheumatoid Arthritis model of DBA/1 mice. The results were expressed

as mean±S.D.

- A: Normal group
- B: Collagen - induced group
- C: Collagen + indomethacin treatment group
- D: Collagen + BHT 200 mg/kg treatment group

## 고찰

최근 들어 산업화 및 서구화에 따른 생활환경의 변화와 함께 아토피피부염 (Atopic Dermatitis, AD), 천식 (Asthma), 류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA)와 같은 염증성 자가면역질환의 발병률이 크게 증가하고 있으며, 이에 대한 사회적 관심과 인식의 증가로 천연물 치료제 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>4,15</sup>. 그러나 새로운 약물과 치료법은 복용을 끊으면 다시 활성화되거나 실제 임상에서 효과가 미비하거나 지속력이 떨어지는 등의 문제로 인하여 여전히 지속적인 연구과제로 남아있다<sup>16</sup>. 또한, 기존의 한의서에서 염증성 자가면역질환과 유사한 병증 중심의 한약 및 한방 처방은 임상 및 실험적 연구 결과를 바탕으로 한 기초자료가 많지 않은 실정이다. 따라서 대증치료라는 한계성과 부작용에 대한 보완적인 EBM 기초 자료가 필요한 실정이다.

염증성 자가면역질환은 외부에서 들어온 항원이 아닌 자신의 세포와 조직에 존재하는 항원에 대한 면역반응의 결과로 조직손상을 수반하며 상처나 외부 이물질의 침입 시 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역 반응을 일으키는 염증성 질환이다<sup>15,17</sup>. 따라서 염증성 자가면역질환은 복합적으로 연결된 염증과 면역반응의 균형을 통한 효과적인 치료가 진행되어야 한다.

본 연구에 사용된 加味防己黃芪湯(BHT)는 防己黃芪湯에 牛膝, 川烏頭, 威靈仙을 가미한 처방으로 현재 임상에서 사용되고 있다. 단일 약물을 통해 박<sup>16</sup> 등이 牛膝이 콜라겐 유도관절염 생쥐에 대한 개선 효과를 보고한 바 있으며, 이<sup>18</sup> 등은 威靈仙 藥鍼이 Collagen, Adjuvant, LPS 및 PLA2 유발 류마티스성 관절염에 미치는 영향을 보고한 바 있고, 최<sup>19</sup> 등은 歷節病에 관한 연구에서 RA에 대한 烏頭의 효능을 보고한 바 있다.

실험에 앞서 BHT의 안전성을 확인하고자 중급속 함량을 검사한 결과, BHT는 카드뮴, 수은, 납, 비소 등이 기준치 이하로 검출되거나 검출되지 않았으며, BHT의 5주간 경구투여 후 실시한 간과 신 독성 검사에서도 정상군과 큰 차이를 나타내지 않아 BHT의 안전성을 확인하였다.

면역글로불린은 바이러스, 세균 등 항원을 비활성화시키고 신체에 침입한 미생물에 대하여 세포 외부 자극을 유도하는 당단백질이다<sup>20</sup>. 1차 면역반응에서는 IgM이 최초로 생성이 되고 IgG는 면역 반응을 주로 담당하며, 2차 면역과정 동안 대량 생산되어 보체 연쇄 반응을 활성화 시켜 대식세포의 식균작용을 돕게 된다<sup>21</sup>. RA가 발생하게 되면 류마티스 유사인자 (rheumatoid factors)라는 자가 항체가 IgM으로 정상적으로 순환중인 IgG와 결합하여 IgM-IgG 복합체를 형성하고 관절에 침착한다<sup>22</sup>. 그리고 IgG는 염증성 자가면역질환이 발생하게 되면 혈액에서 감염부위로 가장 먼저 이동하는 호중구와 Fc수용체를 통해 탐식하게 된다<sup>23</sup>. 이때, 단핵구가 혈액을 순환하다 조직으로 이동하면 대식 세포로 분화하여 염증 유발



물질을 제거하고 체액면역을 담당하는 림프구는 대식세포의 탐식과 파괴 과정을 향진시킨다<sup>24)</sup>. 이와 같은 면역 세포와 기전을 담당하는 것이 백혈구이다. 즉, 면역 반응은 백혈구가 침입한 병원체를 포식하고 면역 세포들을 분비하여 염증반응과 작동세포들의 소환 및 활성화를 유도하게 되는 것이다. 본 연구에서 BHT는 면역글로블린 IgM과 IgG를 유의성 있게 감소시켰으며, 면역 세포인 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구의 생성량을 감소시키는 결과를 확인 할 수 있었다.

이러한 면역 반응을 조절하는 사이토카인은 염증과 자가면역반응 시 Th1 세포를 통해 조절하게 되는데, Th1 세포들은 단핵구(대식세포)와 활막세포를 활성화시켜 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증사이토카인의 분비를 촉진하고 B세포를 자극하여 류마티스 인자(rheumatoid factor), 항콜라겐 항체와 같은 자가항체의 생산과 파골세포의 분화를 유도하여 국소적인 골 파괴를 촉진하기도 한다<sup>25-27)</sup>. 이 중 TNF- $\alpha$ 는 활성화된 단핵구와 대식세포에 의하여 생산되어, 염증의 활성화, 호중구 활성화, 단백질 합성, 세포고사 등을 유발하는 상위 cytokine으로서<sup>28,29)</sup>, IL-1, IL-6와 같은 하위염증매개물질의 생성을 유발하여 염증을 증폭시킨다<sup>30)</sup>. TNF- $\alpha$ 에 의해 생성된 IL-1 $\beta$ 는 연골 및 활막세포로부터 prostaglandin E2, NO를 포함한 다른 염증 매개체의 생산과, MMPs의 발현을 자극하여 골관절염에서 연골분해를 일으키는 강력한 cytokine으로 알려져 있으며<sup>31,32)</sup>, IL-6은 염증 반응시 분비되는 친염증성 cytokine으로, helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되어 면역반응, 조혈, 염증을 조절 한다<sup>33)</sup>. 또한 Katherine 등<sup>34)</sup>은 IL-6가 활액막이나 관절조직의 혈관에서 분비되어 혈청보다 관절액에서 더 높은 활성도를 보인다고 하였는데, 이는 IL-6가 RA에서 면역반응의 매개체로서 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다. 최근에는 Th17이 관절 내 세포들로부터 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 같은 주요 cytokine들과 IL-6, 단백질분해 효소 등의 분비를 유도하여 염증 반응을 심화시켜 급성 관절염을 만성화 시킨다는 것이 많은 연구 결과들을 통해 밝혀짐에 따라 RA의 새로운 매개체로 대두되고 있다<sup>35-37)</sup>. 본 연구에서 BHT는 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  등을 감소시켰으며, 이 중 Th1 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 유의성 있게 감소시켰다. 위와 같은 결과는 BHT가 면역세포 생성량의 감소결과와 RA 및 염증성 사이토카인 감소 결과와 부합됨으로써 BHT가 염증 및 면역 조절에 효과가 있음을 확인하였다.

CRP(반응성단백)는 대표적인 급성기 반응물질로 염증이나 조직 손상에 반응하여 양이 증가하거나 감소하게 되는데, 이러한 이유로 CRP는 급성기 반응물질이라 불리는 여러 단백질중 하나로 여러 감염질환 및 자가면역질환과 관련된 염증의 변화를 감시하는데 사용되며 hs-CRP 검사는 표준 CRP 검사보다 낮은 농도의 해당 단백질을 더 정확히 검출할 수 있는 측정 방법이다<sup>38)</sup>. 본 실험에서 hs-CRP 혈액 검사를 실시 한 결과, BHT 투여군은 대조군에 비하여 hs-CRP 수치가 감소하였다.

RA에 의한 관절 침범은 전신의 모든 관절에 적용되나, 특징적으로 손과 발의 관절, 특히 근위지관관절과 중수(족)지관절에서 미세균성 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 조기 진단과 단계에 맞는 적절한 치료가 필수적이다<sup>5,39,40)</sup>.

본 연구에서 BHT가 관절에 미치는 영향을 확인하기 위해 Micro-CT와 Structural parameter 검사를 통해 RA 병태 모델의 후족부 및 중족지 관절을 확인한 결과, BHT는 대조군에 비하여 중족지 관절과 근위지 관절의 변형과 마디사이의 파괴가 적게 나타났음을 확인할 수 있었으며, BHT는 대조군에 비해 골밀도가 높게 나타났다. 그리고 관절의 염증정도가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, BHT는 안전성 평가를 통해 안전한 것으로 확인되었으며, 염증성 자가 면역질환인 RA에 대해 염증과 면역반응 유관인자 조절을 통해 RA의 병리적 진행을 억제함을 객관적으로 증명해주었다. 따라서 현재 임상에서 활용되고 있는 BHT가 보다 체계적인 임상적인 연구 결과가 진행된다면 EBM (Evidence-based medicine) 구축에 일조할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 류마티스 관절염을 유발한 마우스에서 현재 임상에서 사용되고 있는 加味防己黃芪湯(BHT)의 류마티스 관절염에 대한 안전성, 효능 및 기전을 객관적으로 검증하기 위하여, 중금속 검사 및 RA 동물병태모델에서 간 기능과 신 기능 검사, 면역글로블린 검사, 면역세포 검사, cytokine 검사, hs-CRP 검사, micro CT 및 Structural Parameter 검사를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BHT는 중금속 검사 및 간 기능, 신 기능 검사에서 안전한 것으로 나타났다.
2. BHT 투여군은 대조군에 비해 면역글로블린 IgM과 IgG 수치를 36%, 25%로 감소시켰다.
3. BHT 투여군은 혈액 내 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구 등의 면역세포 검사에서 대조군에 비해 각각 47%, 22%, 56%, 85%로 감소시켰다.
4. BHT 투여군은 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  등의 혈청 내 사이토카인 검사에서 대조군에 비해 각각 29%, 44%, 32%, 24%로 감소시켰다.
5. BHT 투여군은 혈액 내 hs-CRP 검사에서 대조군에 비해 56%로 감소시켰다.
6. BHT 투여군은 micro-CT 검사에서 대조군에 비해 관절의 변형 및 파괴가 적었으며, Structural Parameter 검사에서 대조군에 비해 골밀도는 80% 상승시켰다. 또한 관절의 염증 검사에서도 대조군에 비해 35%로 감소시켰다.

이상의 결과들로 보아 加味防己黃芪湯은 염증 및 면역반응의 유관인자 조절을 통해 류마티스 관절염의 주요 인자들을 감소 효능이 실험적으로 규명되었다. 보다 구체적인 치료 기전은 항 후 보다 심도있는 연구를 통하여 보완되어야 할 것으로 보이나 이와 같은 결과는 加味防己黃芪湯이 류마티스 관절염의 치료제로서 효과뿐만 아니라 다른 염증성 자가면역질환에도 사용될 수 있을 것이라 생각되어지나, 추후 다양한 질환의 임상 전 연구를 통해 밝혀내야 할 것이라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신 센터의 지원에 의한 것입니다.

## References

1. Cho JY. Immunomodulatory effects of ingredients derived from ginseng. *Food Preservation Processing Ind.* 2009 ; 8(2) : 6-12.
2. Cho MR. Targeting Interleukin-17 and Th17 in Immune Inflammatory Diseases. *Hanyang Med Rev.* 2013 ; 33(1) : 17-26.
3. Jun EJ, Kim YK. Activation of innate immune system during viral infection: role of pattern-recognition receptors (PRRs) in viral infection. *J Bacteriol Virol.* 2009 ; 39(3) : 145-57.
4. Kwon HG, Hwang JS, So JS, Lim SH. Immunological homeostasis and inflammatory immune disorders. *Korean Soc Mol Cell Biol.* 2008 ; 20(1) : 48-69.
5. Son GH, Kim YS, Jung JG, Park YG. Effect of Citri Pericarpium ethanol extract on collagen-induced arthritis in mice. *Korea J Herbology.* 2011 ; 26(3) : 1-6.
6. O'Dell, JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 ; 350(25) : 2591-602.
7. Matthew H, Kirk S. The anti inflammatory and antiviral effects of hydroxy chloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996 ; 39(1) : 157-161.
8. Song JS. Toward the cure of rheumatoid arthritis. *Korean J Med.* 2005 ; 69(6) : 581-9.
9. Ahn SH, Ki HH. Lonicerae Flos Inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS Induced Arthritis of Mouse through Regulation of MI. *Korean J Oriental Physiol Pathol.* 2010 ; 24(2) : 242-8.
10. Zhang ZJ. Jin kui yao lue fang lun, Tai bei, Tai lian guo feng chu ban she. 1973 : 28-9.
11. Kim SS, Kim HK, Choi JW, Lee JG. Original Articles : The therapeutic effects of Bangkeehwangkee-tang and Bangkeebokryeong-tang on the hyperlipidemia in rats. *Korea J Herbology.* 2005 ; 20(2) : 149-57.
12. Kim TH, Kim HI, Lee GG, Lee SR, Lee CH. Effects of Banggihwanggi-Tang on Obesity-related Enteroendocrine Cells and Neuropeptides in Mice. *Korean J Oriental Physiol pathol.* 2012 ; 26(4) : 497-505.
13. Kim CU, Ryu DG, Lee EJ. Effect of Astragalus on Renal Function in Rabbits Bangui bath before tangaek impact. *Korea Inst Sci Technol Info.* 1990 ; 1(1) : 183-95.
14. Kim TH, Kang SI, Song MY, Choi JB, Bae GJ, Han JS, Yang MS, Shin YJ. Original Articles : Effects of Bangkeehwangkee-tang(fangjihuangqi-tang) Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. *J Korean Med Rehabil.* 2014 ; 24(2) : 15-30.
15. Lee HJ, Sim BY, Bak JW, Kim DH. Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in Mice. *Korean J Oriental Physiol pathol.* 2014 ; 28(2) : 146-53.
16. Park YK, Kim CS. The therapeutic effect of Achyranthis Radix on the collagen-induced arthritis in mice. *Korea J Herbology.* 2010 ; 25(4) : 129-35.
17. Kim JM, Kim HY. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J korean Med Assoc.* 2010 ; 53(10) : 853-61.
18. Lee JS, Kim KH, Lee SD, Kim KS. The Effect of Clematidis Radix Herbal-acupuncture Solution, on Collagen, Adjuvant, Lipopolysaccharide and Phospholipase A2 Induced Rheumatoid Arthritis in Mice. *J Korean Acupuncture Moxibustion Soc.* 2012 ; 29(1) : 127-37.
19. Choi HS, Kwon OS, Lee JH, Kang YH. The literatural study on ryuk-jeol disease. *J Dongguk Oriental Med.* 1996 ; 5(1) : 97-129.
20. Korean College of Rheumatology. *KCR Textbook of rheumatology.* Seoul : GunJa chulpansa, 2014 : 73, 187-200.
21. Thomas JK, Richard AG, Barbara AO. *kuby Immunology.* Seoul : E Public. 2008 : 100-3.
22. Hwang DH, Han JW, Choi KM, Shin KM, Kim DS. Expression of Toll-like Receptor-2 on the Peripheral Blood Monocytes in Kawasaki Disease Patients. *Korean J Pediatr.* 2005 ; 48(3) : 315-20.
23. Choi SM, Lee KY, Lee HS, Hong JH, Lee MH, Lee BC. A case of meningococcal meningitis with complement 9 deficiency. *Korean J Pediatr.* 2005 ; 48(1) : 101-3.
24. Lee BJ, Yoon SY, Park HW, Park JH, Cho IY, Lee JS, Ryu JH. Effects of Concurrent Administration of Hyeolbuchukeo-tang and Aspirin on Atherosclerosis in the ApoE<sup>-/-</sup> Mouse. *J Korean Med.* 2011 ; 32(1) : 164-74.

25. Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. Molecular targets of rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008 ; 7(1) : 53–66.
26. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity*. 2008 ; 28(4) : 440–4.
27. Ji JD. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Hanyang Med Rev*. 2005 ; 25 : 43–52.
28. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. Seoul : Bummunsa. 2004 : 243–88.
29. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin /TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 ; 330(6149) : 662–4.
30. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007 ; 370(9602) : 1861–74.
31. Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, Polanska M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007 ; 38(3) : 151–6.
32. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum*. 2001 ; 44(9) : 2078–83.
33. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. *J Korean Oriental Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2010 ; 23(1) : 118–34.
34. Katherine L, Manson terry L, Moor James M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994 ; 21(12) : 2359–63.
35. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 ; 62(10) : 2876–85.
36. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007 ; 6(3) : 169–75.
37. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, Varsani H, Hunter P, Wedderburn LR. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum*. 2008 ; 58(3) : 875–87.
38. Hyun Jung Yeo, Ji Hyun Lee, Hong Jik Lee, Ki Sup Byun, Ho Joon Im, Min Jung Kim. Microvascular Findings in Patients with Rheumatoid Arthritis – Assessed, Using Fundus Photography and Fluorescein Angiography. *J Rheum Dis*. 2013 : 20(4) : 231–7.
39. The Korean Orthopaedic Association. *orthopedics*. 5th ed, seoul : cholsin medicine publisher, 2000 : 109–31, 157–74, 176.
40. The Korean Society of Pathologists. *Pathology*. seoul : komoonsa. 1997 : 85, 1166–70, 1672.