

疎經活血湯加味方の 관절염에 미치는 효과

조주현* · 임지성* · 김종규* · 박중현* · 최학순[†] · 황규원[†] · 송용선[†]
원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실*, 원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과[†]

Anti-Arthritic Effect of *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*

Joo-hyun Jo, K.M.D.*, Ji-sung Im, K.M.D.*, Jong-gyu Kim, K.M.D.*, Jung-hyun Park, K.M.D.*,
Hag-soon Choi, M.S.[†], Geu-won Hwang, M.S.[†], Yung-sun Song, K.M.D.[†]

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University*, Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University[†]

본 연구는 2020년도 원광대학교 교내연구비 지원의 결과입니다.

RECEIVED December 15, 2020
REVISED January 12, 2021
ACCEPTED January 14, 2021

CORRESPONDING TO

Yung-sun Song, Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

TEL (063) 850-5114
FAX (063) 850-6666
E-mail yssong@wku.ac.kr

Copyright © 2021 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The aim of this study is to evaluate anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang* (SGHHTGB) in cell and animal models and also to suggest one of putative mechanisms underlying its anti-arthritic effects.

Methods Enzyme-linked immunosorbent assay was applied to measure the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and prostaglandin E2 (PGE2) in culture medium and blood serum and nitric oxide (NO) was assayed by Griess reagent. The expressions of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were analyzed by Western blot method.

Results In a cell model using RAW264.7 macrophages stimulated with the endotoxin lipopolysaccharide (LPS), the drug, at its non-cytotoxic concentrations, inhibited the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-1 β and IL-6. In addition, it suppressed the expression of the inflammatory enzyme iNOS and COX-2, and reduced the synthesis of the enzyme product NO (as stable nitrite) and PGE2 in activated macrophages. Meanwhile, in an animal model using rheumatoid arthritis (RA) mice induced with injection of type II collagen antibody (CAb) and LPS, the drug improved clinical symptom of arthritis and reduced paw thickness and inflammatory cell infiltration. In blood of RA mice, the drug reduced serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, nitrite, and PGE2, all inflammatory mediators produced by activated macrophages.

Conclusions SGHHTGB may ameliorate CAb and LPS-induced RA in mice, presumably by inactivating macrophages that are capable of initiating joint inflammation by producing pro-inflammatory cytokines and expressing inflammatory enzymes. (*J Korean Med Rehabil* 2021;31(1):33-46)

Key words *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, Rheumatoid arthritis, Anti-arthritic effect, Pro-inflammatory cytokine, Macrophages

서론»»»»

관절염은 활막(synovial membrane)에 염증이 발생하거나 연골이 손상되는 질환으로 크게 골관절염(osteoarthritis)과 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)으로 구분

할 수 있다¹⁾. 골관절염은 특정 관절부위에 염증 또는 연골 손상이 발생하는 국부적 질환으로 주로 회복 능력이 떨어지는 노인 환자에서 많이 발견된다²⁾. 반면 류마티스 관절염은 모든 관절부위에 염증과 함께 연골 손상이 동시에 발생하는 전신적 질환으로 일종의 자가면역

질환이다²⁾. 류마티스 관절염은 활막의 염증으로 특징되는 자가면역질환을 말하며, 자신의 면역세포가 자신의 관절을 적으로 잘못 인식하여 염증반응을 유발하는 만성적 염증질환이다³⁻⁵⁾. 류마티스 관절염의 발병기전은 어떤 원인에 의해 활성화된 면역세포가 활막의 활액(synovial fluid)으로 침윤하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6와 같은 전염증성(pro-inflammatory) cytokine을 생성하고, cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 염증성 효소를 발현하여 prostaglandin E2 (PGE2) 및 nitric oxide (NO)와 같은 염증성 물질을 생성한다⁶⁻¹⁰⁾. 특히 활성화된 활막 대식세포(synovial macrophage)에 의해 과량으로 생성된 전염증성 사이토카인은 염증반응의 크기 및 기간을 증가시키고, 염증성 물질은 통증 및 관절 파괴와 변형을 유발한다¹¹⁻¹³⁾.

류마티스 관절염의 임상적 치료는 약물을 사용하여 관절의 염증을 완화시켜 통증과 관절 손상을 방지하는 것을 목적으로 한다¹⁴⁾. 비스테로이드성 약물¹⁵⁾, 부신피질 호르몬제¹⁶⁾, 항-TNF- α 제제¹⁷⁻¹⁹⁾, 면역억제제^{20,21)}가 현재 널리 사용되고 있는 류마티스 관절염 치료 약물이다. 그러나 이들 약물은 위, 간, 신장의 기능장애 및 면역력 감소와 같은 부작용을 유발하여 장기간 사용에 있어서 많은 한계점이 있을 수 있다²²⁾. 따라서 보다 효과적이고 안전성이 입증된 새로운 치료제 또는 치료법의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다²³⁾.

한의학에서 류마티스 관절염은 ‘痺症, 歷節風, 鶴膝風’ 등의 범주로 보고, 그 발병원인은 ‘風, 寒, 濕, 熱’의 邪氣가 正氣가 虛弱한 생체의 經絡으로 侵入하거나 關節에 凝滯되어 血氣의 運行이 저해됨으로써 발병하는 것으로 보고 있다²⁴⁻²⁷⁾.

疎經活血湯은 『萬病回春』²⁸⁾에 처음 기재된 處方으로 ‘遍身走痛如刺’, ‘左足痛尤甚’, ‘晝輕夜重’, ‘痛風血虛’ 등에 활용되며, 四物湯을 原方으로 하고 清濕化痰湯을 加減合方한 方劑로 滯血을 疏通하고 風濕을 驅逐함으로써 疎風, 活血, 行濕하는 작용하여 神經痛, 筋肉痛, 腰痛, 關節痛 등에 활용되었다²⁸⁻³¹⁾.

疎經活血湯의 항염증, 진통, 관절염 개선 효과 등을 규명하는 실험적 연구를 살펴보면 carrageenan 및 dextran 유도 염증 모델과 열 및 기계적 자극으로 유도된 말초신경병증성 모델에서 疎經活血湯의 항염증 효과와

진통 효과가 각각 보고되었으며^{32,33)}, 제2형 콜라겐(type II collagen) 유도 류마티스 관절염 모델에서 疎經活血湯 加味の 면역억제 효과와 adjuvant 유도 류마티스 관절염 모델에서 疎經活血湯合黃連解毒湯의 항염증 효과가 각각 보고되었다^{34,35)}. 그러나 疎經活血湯을 류마티스 관절염 임상 치료에 활용하기 위해서는 다른 형태의 류마티스 관절염 실험 모델에서도 약물의 유효성을 검증할 필요성이 있다.

이에 본 연구는 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 대식세포 모델에서 疎經活血湯의 항염증 효과 및 진통 효과를 높이기 위해 鎮痛, 清熱解毒, 消炎, 消腫 등의 效能이 있는 白屈菜³⁶⁾를 加味한 疎經活血湯加味方 (Sogyunghwalhyeltang-gamibang, SGHHTGB)의 항염증 효과를 조사하고, 제2형 콜라겐 항체(type II collagen antibody, CAb)와 LPS로 유도된 류마티스 관절염 모델에서 SGHHTGB의 관절염 완화 효과를 조사한 결과, 유의한 실험결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 시약

Tetrazolium bromide salt (MTT), LPS, dimethylsulfoxide (DMSO), trypsin-EDTA, dexamethasone, hematoxylin&eosin (H&E), penicillin, streptomycin, Dulbecco's modification Eagle medium (DMEM), β -actin 1차 항체, anti-IgG 2차 항체 및 fetal bovine serum (FBS)는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 제2형 콜라겐 항체(CAb) cocktail은 Chondrex 사(Woodinville, WA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-iNOS 및 anti-COX-2 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 기타 사용된 다른 시약은 분석등급으로 Sigma-Aldrich 사 및 Merck 사(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

2) 기기

원심분리기(centrifuge; Sigma Co., Cookstown, NJ,

USA), 진동혼합기(vortex mixer; Vision Scientific Co., Daejeon, Korea), 이산화탄소(CO₂) 세포배양기(Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA), 고온고압소독기 (autoclave; Sanyo Co., Osaka, Japan), clean bench (Vision Scientific Co.), 미세절단기(microtome; Leica, Wetzler, Germany), 미세배양접시 광학측정기(microplate reader; Molecular Devices Co., San Jose, CA, USA), 배양접시 진탕기(plate shaker; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 도립 광학현미경(inverted microscope; Carl Zeiss Co., Oberkochen, Germany), 케미닥 영상분석기(Chemidoc™ image analyzer; Bio-Rad) 등이 본 실험에 주로 사용되었다.

3) 실험동물

5주령 수컷 BALB/c mice (평균 무게: 23.11±2.31 g)를 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 일주일 동안 순화시킨 다음에 류마티스 관절염(RA) 실험에 사용하였다. 동물사육실의 사육환경은 다음과 같다: 명암은 12시간 간격, 실내온도는 23±2°C, 실내습도는 50~60%로 조절하였다. 동물

실험의 연구자는 원광대학교 동물실험지침(Wonkwang University Guide for Animal Experimentation)을 준수하며 동물실험을 수행하기 전에 원광대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다(WKU20-95).

4) 약재 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 SGHHTGB은 『萬病回春』에 기록된 疎經活血湯(芍藥, 川芎, 生地黃, 當歸, 防己, 羌活, 防風, 蒼朮, 白茯苓, 威靈仙, 白芷, 龍膽草, 陳皮, 牛膝, 桃仁, 生薑, 甘草)에 白屈菜를 加味한 처방이다. 사용한 모든 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 조제하여 사용하였고, 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

모든 약재는 균일하게 분쇄하여 분말형태로 만든 다음 분말(65.6 g) 부피의 10배에 해당하는 2차 증류수를 첨가하고 100°C (±3°C)에서 2시간 동안 환류냉각기가 부착된 둥근바닥 플라스크에서 추출하였다. 추출된 용액은 정성필터(Advantech, Taipei, Taiwan)로 흡입 여과지가 부착된 삼각 플라스크에서 여과한 다음 회전형 감압농축기(rotary evaporator; Eyela Co., Tokyo, Japan)를

Table 1. The Prescription of *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*

Herbal name	Pharmaceutical name	Dose (g)
Peony Root	<i>Paeoniae Radix</i>	6.0
Angelica Gigas Root	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.8
Fresh Rehmania Root	<i>Rehmanniae Radix Crudus</i>	4.0
Atractylodes Rhizome	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4.0
Achyranthes Root	<i>Achyranthis Radix</i>	4.0
Citrus Unshiu Peel	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	4.0
Peach Kernel	<i>Pergicae Semen</i>	4.0
Clematis Root	<i>Clematidis Radix</i>	4.0
Poria	<i>Poria Sclerotium</i>	2.8
Cnidium Rhizome	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2.4
Sinomenium Stem and Rhizome	<i>Sinomeni Caulis et Rhizoma</i>	2.4
Ostericum Root	<i>Osterici Radix</i>	2.4
Saposhnikovia Root	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	2.4
Angelica Dahurica Root	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2.4
Gentian Root and Rhizome	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	2.4
Licorice	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	1.6
Raw Ginger	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	4.0
Greater Celandine Herb	<i>Chelidonii Herba</i>	8.0
	Total amount	65.6

이용하여 농축하였다. 이어서 농축액은 초저온 동결건조기(ultra-low temperature freezer; NuAire, Plymouth, MN, USA)를 사용하여 건조하였다. 이러한 추출, 농축 및 건조 과정에서 28.85 g (31.27%)의 건조물(열수 추출물)을 얻었다. 건조 추출물은 실험에 사용되기 전까지 -70°C에서 냉동 보관하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

설치류 대식세포(macrophage)인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. 이 세포는 비활성화된 FBS (10%) 및 penicillin과 streptomycin이 혼합된 항생제(1%)를 포함한 DMEM 배지와 37°C, CO₂ (5%), 일정한 습도가 유지된 세포 배양기를 이용하여 배양하였다.

2) 세포 독성

MTT 측정법을 이용하여 세포생존율을 측정할 다음 세포생존율 대비 세포 독성을 평가하였다. 실험방법을 간단히 기술하면 48-well plate (Corning, Corning, NY, USA)에 대식세포를 2×10⁵ cells/well 수로 각 well에 분주하여 6시간 배양하여 세포를 안정화시킨 다음 배양 배지를 새로운 배양배지로 교환하였다. 이어서 여러 농도의 시료를 각 well에 처리한 다음 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 각 well에 MTT (5 mg/mL) 시약 20 μL을 첨가하고 1시간 동안 배양하여 살아있는 세포에서 MTT 환원에 의한 formazan 생성을 유도하였다. 각 well에 생성된 formazan은 DMSO를 첨가하여 용해시킴으로써 자색의 변화를 유도하였다. 용해액을 96-well plate (Corning)에 일정량으로 분주하고, microplate reader를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 formazan의 농도를 결정하였다.

3) Cytokine 측정

12-well plate에 대식세포를 5×10⁵ cell/mL 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂, 일정한 습도 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 SGHHTGB을 처리하고 LPS (100 ng/mL)를 첨가하여 대식세포를 18시간 동안 자극하였다. 이어서 plate의 각 well에서 상층용액 500 μL을

회수하여 냉동 보관하였다. 세포배양 상층용액과 실험 동물의 혈액에서 분리된 혈청에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 농도를 측정하기 위해 해당 cytokine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 측정실험 절차는 해당 kit 공급자가 제공한 protocol에 따라서 각 cytokine 농도를 측정하였다. 간단히 기술하면, 실온에서 포집(capture) 항체가 코팅된 well에 cytokine 항원 표준용액(50 μL), 세포배양 상층용액(50 μL) 또는 혈청(50 μL)을 첨가하고 2시간 동안 항원-항체 반응을 유도하였다. 이어서, 유리(free) 항체 용액을 첨가하여 2시간 반응시키고, 효소결합(enzyme-linked) 항체 용액을 첨가하여 1시간 반응시키고, 효소기질 시약을 첨가하여 20분 반응시키고, 마지막으로 반응종결 용액을 첨가하여 20분간 실온에 방치하여 측정실험을 완결하였다. 이후 microplate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 반응이 종결된 각 well의 흡광도 값과 표준용액의 흡광도 값을 측정하여 cytokine 농도를 결정하였다.

4) NO 측정

iNOS 염증효소에서 생성되는 NO 농도를 결정하기 위해 실온에서 안정한 nitrite (NO₂⁻)의 농도를 측정하였다. 실험방법을 간단히 기술하면 RAW264.7 대식세포를 5×10⁵ cell/mL 농도로 12-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂, 일정한 습도 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 SGHHTGB을 처리하고 LPS (100 ng/mL)를 첨가하여 대식세포를 18시간 동안 자극하였다. 이어서 plate의 각 well에서 상층용액 500 μL을 회수하여 냉동 보관하였다. 한편, 혈청 nitrite의 농도는 먼저 혈청에 함유된 단백질을 ZnSO₄ (30%)용액 10 μL을 첨가하여 침전시킨 다음 원심분리기로 상층용액과 단백질 침전물을 분리하였다. 이어서 상층용액에 nitrate reductase/NADH 혼합액(R&D Systems)을 10 μL을 첨가하여 nitrate를 nitrite로 환원하였다. Nitrite 표준용액, 배양배지에서 회수한 상층용액 및 단백질을 제거하고 nitrate를 nitrite로 환원시킨 혈청을 96-well plate에 50 μL씩 각각 분주하였다. 이어서 100 μL의 Griess 용액(1% sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine가 1대 2의 비율로 혼합된 초산 용액)을 첨가하고, 실온 및 차광 상태에서 10분 동안 발색반응을 유도하였다. 이와

같이 Griess 반응을 완결한 다음 microplate reader를 이용하여 570 nm 파장에서 각 well의 흡광도와 표준용액의 흡광도를 측정하여 세포배양 배지 및 혈청 시료의 nitrite 농도를 계산하였다.

5) PGE2 측정

활성화된 대식세포에서 발현되는 COX-2 염증효소에서 생성되는 PGE2 염증매개 물질의 농도를 조사하기 위해 다음과 같이 실험하였다. 실험방법을 간단히 기술하면, RAW264.7 대식세포를 5×10^5 cell/mL 농도로 12-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂, 일정한 습도 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 SGHHTGB을 처리하고 LPS (100 ng/mL)를 첨가하여 대식세포를 18시간 동안 자극하였다. 이어서 plate의 각 well에서 상층용액 500 μ L을 회수하여 냉동 보관하였다. 세포배양 상층용액과 실험동물의 혈액에서 분리된 혈청에서 PGE2의 농도를 측정하기 위해 PGE2 ELISA kit (R&D Systems)를 사용하였다. 측정실험 절차는 해당 kit 공급자가 제공한 protocol에 따라 PGE2 측정실험을 수행하였으며, microplate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 반응이 종결된 각 well의 흡광도 값과 표준용액의 흡광도 값을 측정하여 PGE2 농도를 결정하였다.

6) Western blotting 분석

RAW264.7 대식세포를 5×10^5 cell/mL 농도로 6-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂, 일정한 습도 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 SGHHTGB을 처리하고 LPS (100 ng/mL)를 첨가하여 대식세포를 12시간 동안 자극하였다. 자극이 끝난 각 well을 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척한 다음 세포용해 완충용액(cell lysis buffer)을 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리를 사용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질에 Bradford™ 용액(Bio-Rad)을 첨가하여 단백질을 정량하였다. 12% 농도의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 일정량의 단백질을 적재한 다음 전기영동을 수행하여 크기별로 단백질을 분리하였다. 이어서 SDS-PAGE에 포함된 크기별 단백질은 전기영동 방법으로 나이트로셀룰로스 막에 전사하였다. 4°C에서 5% 탈지방유가 포함된 완충용액을 사용하여 단백질이 전사된 나이트로셀룰로스 막을 유단백

질로 고정된 다음 PBS를 사용하여 고정된 나이트로셀룰로스 막을 2회 세척하였다. 고정된 나이트로셀룰로스 막에 1차 항체인 anti-iNOS, anti-COX-2 또는 β -actin을 1대 1,000의 비율로 희석하여 첨가하고 12시간 동안 항원-항체 반응을 유도한 다음 PBS로 2회 세척하여 반응하지 않은 1차 항체를 제거하였다. 이어서 발광효소가 연결된 anti-IgG 2차 항체를 1대 1,000의 비율로 희석하여 첨가하고 1시간 동안 항체-항원 반응을 유도한 다음 PBS로 2회 세척하여 반응하지 않은 2차 항체를 제거하였다. 마지막으로 2차 항체에 연결된 발광효소의 기질이 들어 있는 ECL 용액(Bio-Rad)을 첨가하여 화학발광을 유도하였다. 발광 정도를 Chemidoc™ image analyzer로 분석하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

7) 류마티스 관절염 유도

BALB/c mouse의 복강에 5 mg의 CAb 항체를 주사하고, 3일 후에 100 μ g LPS 내독소를 복강에 다시 주사하여 류마티스 관절염(RA)을 유도하였다. RA가 유도된 실험동물은 300 mg/kg SGHHTGB을 섭취시킨 실험군, 500 mg/kg SGHHTGB을 섭취시킨 실험군, SGHHTGB이 포함되지 않은 증류수를 섭취시킨 대조군(control group)으로 구분되었고, RA를 유발하지 않은 정상군(normal group)과 모든 군을 비교하였다. SGHHTGB은 CAb 복강 주사를 시작한 첫 날부터 매일 1회 구강으로 투여하였다. 실험동물 3R 윤리원칙에 따라 실험동물의 마리 수의 산정은 통계적으로 의미가 있는 최소의 마리 수를 사용하였고, 실험에 이용된 모든 실험동물은 RA 유도 15일 후에 마취하여 혈액을 채취하고 희생하여 필요한 장기를 얻었다.

8) 질병 활성도

Table II에 설정된 기준으로 RA가 유도된 실험동물의 4개의 발(paw)에서 관절염 징후를 점수로 환산하여 관절염 지수(arthritis score)를 측정하였다³⁵⁾. 관절염 지수는 16 (4 paws×4 points)점 만점으로 계산하였고, 발의 두께는 4개의 발등의 두께를 모두 합산하여 평균값을 사용하였다.

9) 혈청 분리

실험 마지막 날에 모든 실험동물을 diethyl ether를 사

Table II Clinical Evaluation of Arthritis Score

Grade	Clinical symptom
0	No arthritis
1	Light edema at the point of a toe
2	Edema at several points on a toe or in the joints of the wrist or ankle
3	Pervading edema involving the entire paw
4	Maximal pervading edema involving the entire paw and deformation of joints (ankylosis) with impaired function

용하여 마취시켰다. 혈액 응고를 방지하는 EDTA가 코딩된 주사기와 혈액채취 용기를 사용하여 마취된 실험동물의 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 1시간 상온에서 안정화시키고, 20,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액 혈청을 얻었다. 모든 혈청은 혈청 분석 실험에 사용할 때까지 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다.

10) 병리조직학적 관찰

실험에 이용된 모두 실험동물은 diethyl ether로 마취된 상태에서 희생되었다. 희생된 실험동물의 관절부위를 세밀하게 절개하여 필요한 조직을 적출하였다. 적출된 조직은 생리식염수를 사용하여 세척하고 여과지로 수분을 제거하였다. 또한, 뼈 조각을 제거하기 위해, 조직을 decalcifying solution (Sigma-Aldrich)에서 2주간 침강시켜 탈회를 유도하였다. 탈회된 조직은 수분을 제거한 다음 파라핀을 사용하여 포매하였다. 이어서 포매된 조직을 4 µm의 두께로 정밀하게 절단하여 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드에 대해 H&E 염색을 수행한 다음 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.

11) 통계처리

모든 실험의 측정값은 평균±표준오차(standard error of mean)로 표기하였다. 통계처리는 Prism 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 그룹 간의 차이는 Student's *t* test를 실시하여 확인하였다. 필요한 경우, 다중 비교는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 통한 Dunnett 검사를 수행하여 사후 검정하였다. *p*값이 0.05보다 작을 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과»»»»

1. 세포 독성

RAW264.7 대식세포에서 SGHHTGB의 세포독성을 MTT 방법으로 조사하였다. 세포독성이 관찰되지 않는 SGHHTGB의 처리농도(working concentration)를 결정하기 위해 대식세포에 SGHHTGB을 100, 300, 500, 700, 900 µg/mL 농도로 24시간 처리하였다. SGHHTGB을 처리하지 않은 대조군(control)과 SGHHTGB을 100 µg/mL 농도에서 500 µg/mL 농도까지 처리한 실험군 사이의 세포생존에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 SGHHTGB을 700 µg/mL 이상의 농도로 대식세포에 처리할 경우 세포독성을 의미하는 세포생존율의 감소가 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 관찰결과로부터 RAW264.7 대식세포에서 SGHHTGB의 처리농도를 100, 300, 500 µg/mL 농도로 결정하였다.

2. 활성화된 대식세포에서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성

활성화된 RAW264.7 대식세포에서 SGHHTGB 처리가 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 생성에 미치는 효과를 ELISA 방법으로 조사하기 위해 대식세포에 SGHHTGB을 100, 300, 500 µg/mL 농도로 처리한 다음 LPS로 자극하였다. LPS로 자극하지 않은 대조군과 비교할 경우 LPS에 의해 자극되어 활성화된 대식세포의 TNF-α 생성은 큰 값으로 증가하였다. 이러한 TNF-α 생성은 100 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에서는 유의한 차이가 없었고 300, 500 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 한편, 활성화된 대식세포의 IL-1β 및 IL-6 생성 또한 100 µg/mL 농

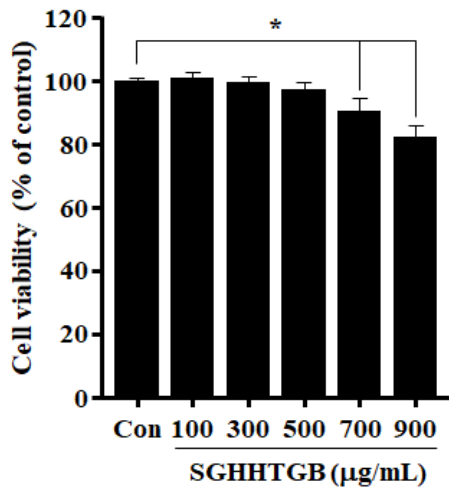


Fig. 1. Effects of SGHHTGB on viability in RAW264.7 macrophages. Macrophages were treated for 24 h with the vehicle (Con) or the indicated concentrations of SGHHTGB. Viability was determined by MTT assay, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, Con: control, MTT: tetrazolium bromide salt. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

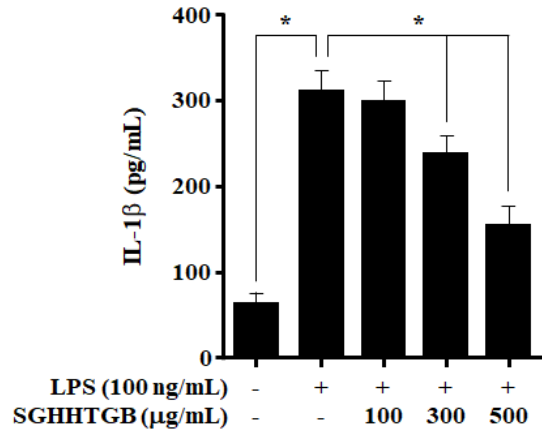


Fig. 3. Effects of SGHHTGB on IL-1β production in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 18 h with LPS (100 ng/mL). The concentrations of IL-1β produced by activated macrophages were determined using IL-1β ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, IL-1β: interleukin-1 β, LPS: lipopolysaccharide, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

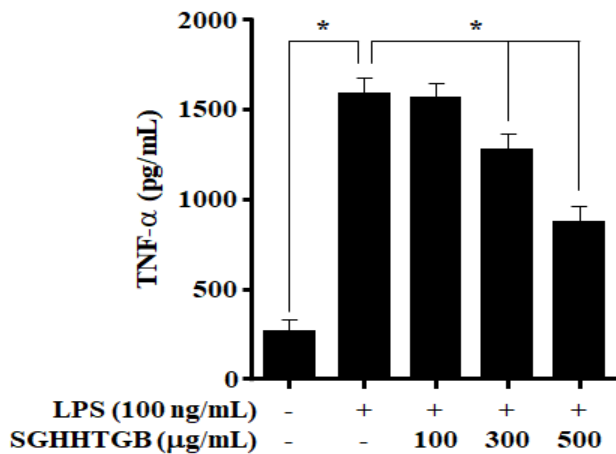


Fig. 2. Effects of SGHHTGB on TNF-α production in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 18 h with LPS (100 ng/mL). The concentrations of TNF-α produced by activated macrophages were determined using TNF-α ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, TNF-α: tumor necrosis factor-α, LPS: lipopolysaccharide, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

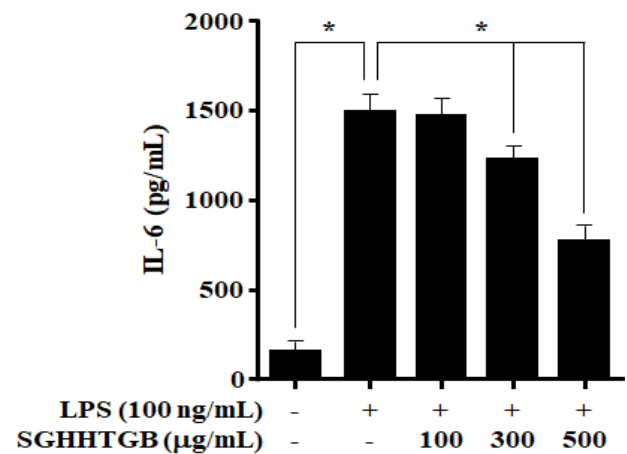


Fig. 4. Effects of SGHHTGB on IL-6 production in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 18 h with LPS (100 ng/mL). The concentrations of IL-6 produced by activated macrophages were determined using IL-6 ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, IL-6: interleukin-6, LPS: lipopolysaccharide, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

도의 SGHHTGB 처리에서는 유의한 차이가 없었고, 300, 500 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에 의해 유의

하게 감소하였다(Figs. 3, 4).

3. 활성화된 대식세포에서 iNOS 및 COX-2 발현

활성화된 RAW264.7 대식세포에서 SGHHTGB 처리가 염증성 효소로 알려진 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 효과를 Western blotting 방법으로 조사하기 위해 대식세포에 SGHHTGB을 100, 300, 500 µg/mL 농도로 처리한 다음 LPS로 자극하였다. LPS로 자극하지 않은 대조군과 비교할 경우 LPS에 의해 자극되어 활성화된 대식세포의 iNOS 및 COX-2 발현이 큰 폭으로 증가하였다. 이러한 iNOS 및 COX-2 발현은 100 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에서는 유의한 차이가 없었고, 300, 500 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 5). 한편, iNOS 및 COX-2의 최종 생성물로 알려진 NO 및 PGE2 분비 또한 100 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에서는 유의한 차이가 없었고, 300, 500 µg/mL 농도의 SGHHTGB 처리에 의해 유의하게 감소하였다(Figs. 6, 7).

4. RA 실험동물에서 관절염 완화 효과

제2형 콜라겐 항체(CAb)와 내독소(LPS)로 유도된 류마티스 관절염(RA) 실험동물에서 관절염 지수와 발의

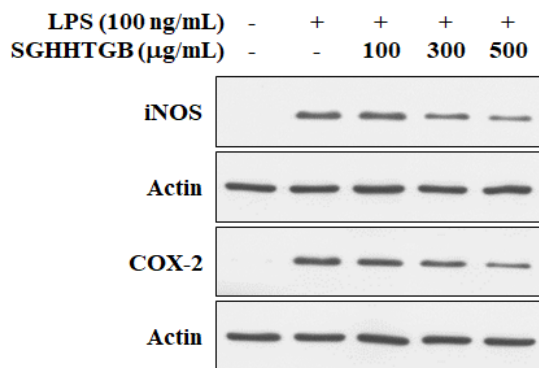


Fig. 5. Effects of SGHHTGB on iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 12 h with LPS (100 ng/mL). Western blotting analysis for iNOS and COX-2 proteins was carried out as described in Materials and Methods. The bolts illustrated in this figure are representative of 3 independent experiments. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, iNOS: inducible nitric oxide synthase, COX-2: cyclooxygenase-2, LPS: lipopolysaccharide.

부종을 조사하여 300, 500 mg/kg의 농도로 SGHHTGB의 관절염 완화 효과를 평가하였다. 정상 실험동물과 다르게 CAb을 주사하고 3일 후에 LPS를 주사한 RA 실험동물에서는 질병 활성도를 나타내는 관절염 지수와

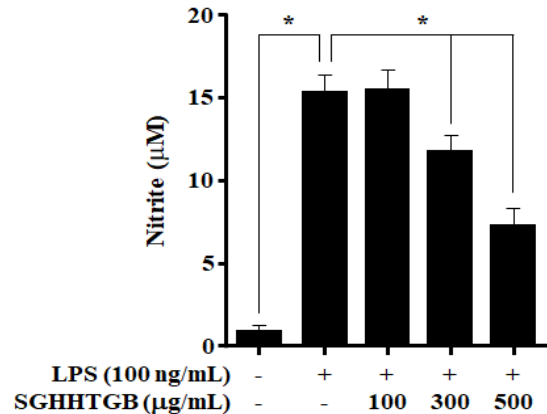


Fig. 6. Effects of SGHHTGB on NO production in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 18 h with LPS (100 ng/mL). The concentrations of the NO metabolite nitrite produced by activated macrophages were determined by Griess reagent, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, NO: nitric oxide, LPS: lipopolysaccharide. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

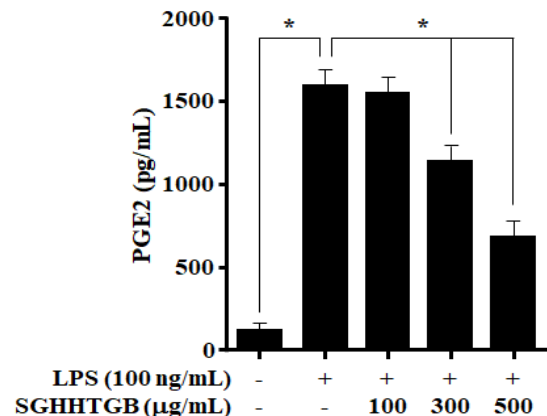


Fig. 7. Effects of SGHHTGB on PGE2 production in RAW264.7 macrophages. Macrophages were incubated for 1 h with medium alone (control) or SGHHTGB (100, 300, and 500 µg/mL), and then stimulated for 18 h with LPS (100 ng/mL). The concentrations of PGE2 produced by activated macrophages were determined by PGE2 ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, PGE2: prostaglandin E2, LPS: lipopolysaccharide, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=4). *p<0.05.

염증의 정도를 보여주는 발의 부종이 큰 값으로 증가하였다. 그러나 이러한 관절염 지수와 발의 부종은 300, 500 mg/kg의 SGHHTGB 구강 투여에 의해 유의하게 감소하였다(Figs. 8, 9).

5. RA 실험동물에서 염증세포 침윤 억제 효과

SGHHTGB의 관절염 완화 효과가 염증부위의 염증세포 침윤(infiltration)과 관련이 있는지 조사하기 위해 실험에 참여한 모든 실험동물을 희생시켜 발의 조직을 hematoxylin 염료와 eosin 염료로 염색한 다음 염증세포 침윤을 관찰하였다. RA 실험동물의 염증 조직에서는 많은 수의 염증세포 침윤이 관찰되었으나, 300, 500 mg/kg

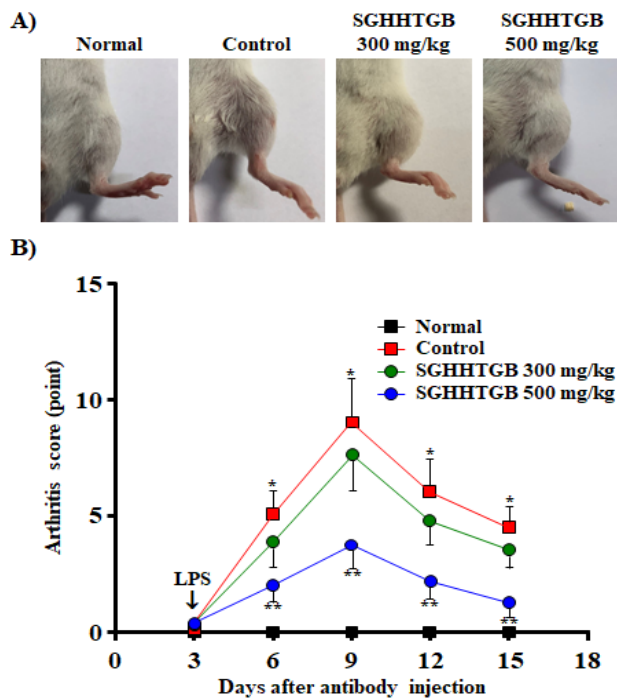


Fig. 8. Anti-arthritis effects of SGHHTGB. (A) Representative pictures of the clinical observations on the right legs of BALB/c mice with RA. (B) Effect of SGHHTGB on arthritis progression. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 μ g) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. SGHHTGB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water. Data are the mean \pm standard error of mean (n=6). *p<0.05 with respect to normal mice, **p<0.05 with respect to control RA mice.

의 SGHHTGB을 구강으로 투여한 RA 실험동물의 염증 조직에서는 염증세포 침윤의 감소가 관찰되었다(Fig. 10).

6. RA 실험동물에서 혈청 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 변화

SGHHTGB의 염증세포 침윤 억제 효과가 대식세포의 활성화 억제와 관련이 있는지 조사하기 위해 실험에 참여한 모든 실험동물에서 혈액을 채취하여 활성화된 대식세포 매개 전염증성(pro-inflammatory) cytokine으로 알려진 혈청 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 변화를 측정하였다. RA 실험동물의 혈액에서는 높은 농도의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6가 측정되었으나 300, 500 mg/kg의 SGHHTGB을 1일

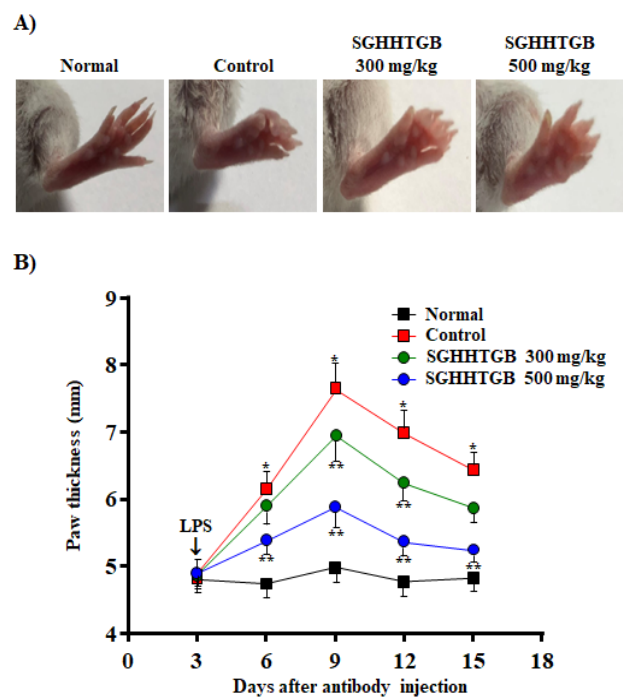


Fig. 9. Anti-inflammatory effects of SGHHTGB. (A) Representative pictures of the clinical observations on the right paws of BALB/c mice with RA. (B) Effect of SGHHTGB on paw thickness. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 μ g) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. SGHHTGB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water. *p<0.05 with respect to normal mice, **p<0.05 with respect to control RA mice.

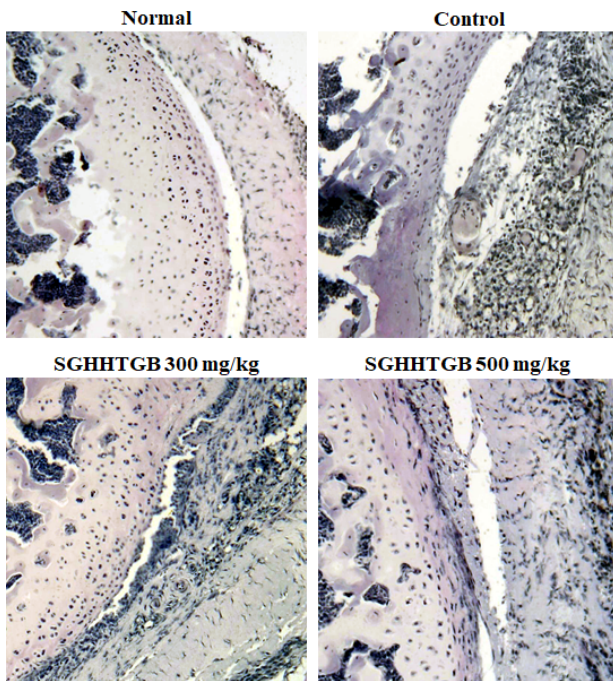


Fig. 10. Histopathological observation of the sections of right legs of BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Sections from each mouse were stained with hematoxylin and eosin, and observed using a light microscope (x100). Sections are representatives of more than 6 observations. SGHHTGB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water.

1회 구강으로 투여한 RA 실험동물의 혈액에서는 상대적으로 낮은 농도의 cytokine이 측정되었다(Figs. 11-13).

7. RA 실험동물에서 혈청 NO 및 PGE2 변화

SGHHTGB의 염증세포 침윤 억제 효과가 대식세포의 활성화 억제와 관련이 있는지 조사하기 위해, 실험에 참여한 모든 실험동물에서 혈액을 채취하여 활성화된 대식세포에서 주로 분비되는 염증매개 물질로 알려진 혈청 nitrite 및 PGE2 변화를 측정하였다. RA 실험동물의 혈액에서는 높은 농도의 nitrite 및 PGE2가 측정되었으나 300, 500 mg/kg의 SGHHTGB을 1일 1회 구강으로 투여한 RA 실험동물의 혈액에서는 상대적으로 낮은 농도의 nitrite 및 PGE2가 각각 측정되었다(Figs. 14, 15).

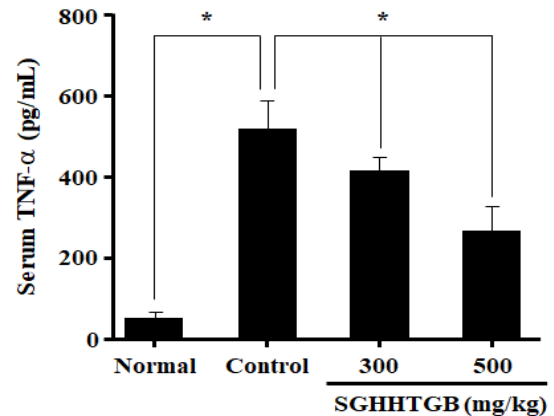


Fig. 11. Effect of SGHHTGB on serum TNF-α in BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Serum levels of TNF-α were determined using TNF-α ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTGB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, TNF-α: tumor necrosis factor-α, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=6). *p<0.05.

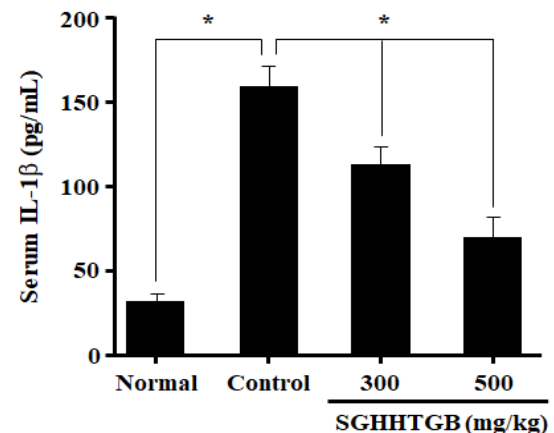


Fig. 12. Effect of SGHHTGB on serum IL-1β in BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Serum levels of IL-1β were determined using IL-1β ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTGB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, IL-1β: Interleukin-1β, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=6). *p<0.05.

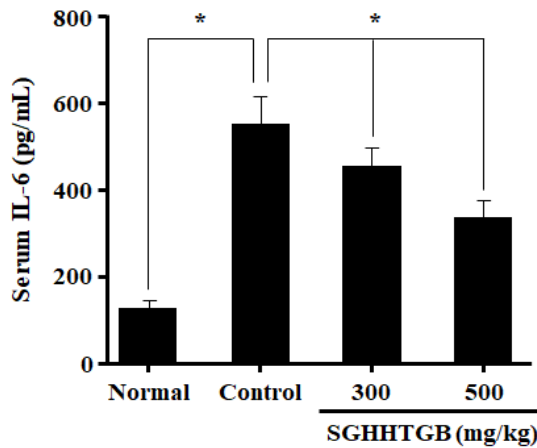


Fig. 13. Effect of SGHHTGB on serum IL-6 in BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Serum levels of IL-6 were determined using IL-6 ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, IL-6: interleukin-6, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=6). *p<0.05.

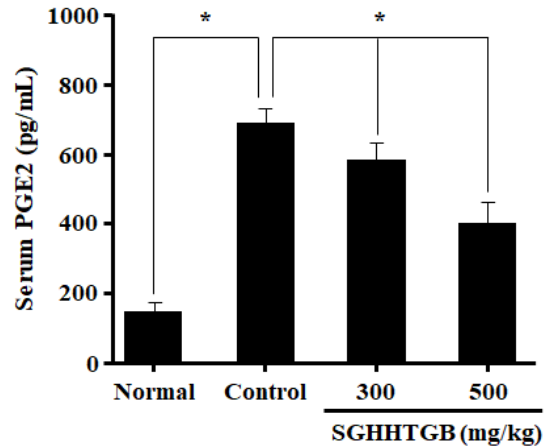


Fig. 15. Effect of SGHHTGB on serum PGE2 in BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Serum levels of PGE2 were determined by PGE2 ELISA kit, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, PGE2: prostaglandin E2, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. Data are the mean±standard error of mean (n=6). *p<0.05.

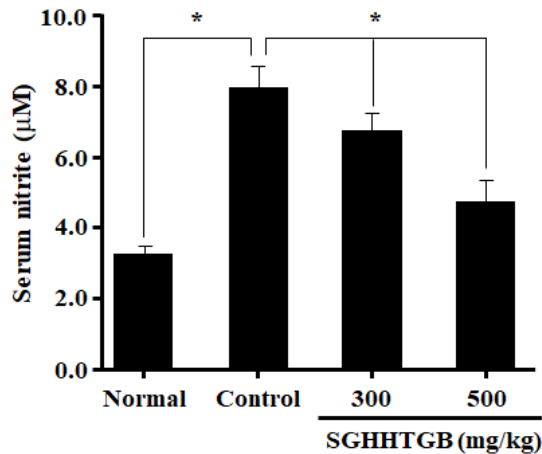


Fig. 14. Effect of SGHHTGB on serum nitrite in BALB/c mice with RA. Normal mice received neither injection nor treatment (Normal). RA mice received intraperitoneal injection of CAb cocktail (5 mg) on day 1 and LPS (100 µg) on day 3. After antibody injection, RA mice received oral treatment with DW (Control) or SGHHTGB (300 mg/kg or 500 mg/kg) once a day for 15 days. Serum levels of nitrite were determined by Griess assay, as described in Materials and Methods. SGHHTCB: *Sogyunghwalhyel-tang-gamibang*, RA: rheumatic arthritis, CAb: collagen antibody, LPS: lipopolysaccharide, DW: distilled water. Data are the mean±standard error of mean (n=6). *p<0.05.

고찰»»»»

疎經活血湯은 『萬病回春』에記載되었으며, ‘四肢歷節遊走痺痛’에 활용되며, 補血活血의 작용이 있는 四物湯(白芍藥, 川芎, 生地黃, 當歸)에 祛風濕藥(防己, 羌活, 防風, 蒼朮, 白茯苓)과 除風濕通經絡의 작용이 있는 威靈仙, 鎮靜效果가 있는 白芷, 消炎效果가 있는 龍膽草, 利氣의 작용이 있는 陳皮, 補肝腎強筋骨의 작용이 있는 牛膝, 活血祛瘀의 작용이 있는 桃仁, 解表散寒의 작용이 있는 生薑, 藥性調和의 작용이 있는 甘草로 구성된 處方이다²⁸⁻³¹). 白屈菜는 性은 涼하고 味는 苦하며, 肺, 脾, 胃經에 歸經하고, 鎮痛, 止咳, 清熱解毒 등의 效能이 있는 本草이다³⁶). 본 연구에 사용된 SGHHTGB은 疎經活血湯의 임상적 치료 효과를 높이기 위해 疎經活血湯에 白屈菜를 加味한 處方이다.

제2형 콜라겐(type II collagen) 유도 RA 모델과 adjuvant 유도 RA 모델에서 疎經活血湯의 관절염 완화 효과가 검증되었으나^{34,35}), 제2형 콜라겐 항체(CAb) 유도

RA 모델에서는 疎經活血湯의 효능이 검증된 바 없다. 본 연구는 CAb과 LPS로 유도된 RA 모델에서 SGHHTGB의 관절염 완화 효과를 조사하였다.

콜라겐은 인간 및 척추동물의 생체를 구성하는 기능성 단백질로 약 12종류가 있으며, 특히 제1형(Type I), 제2형, 제3형, 제4형, 제5형 콜라겐이 인간 생체에 가장 많이 존재한다^{37,38}. 이들 중에서 제2형 콜라겐은 연골을 구성하는 주요 단백질이며 관절연골 교원질의 90%를 차지한다^{39,40}. 대부분의 mouse 계열(strain)에서 제2형 콜라겐은 자기항원(self antigen)으로 작용하여 자가면역질환으로 알려진 RA를 유발하지 않는다⁴¹. 이러한 생리적 상태를 면역학적으로 자기관용(self tolerance)이라고 한다. 그러나 특정 mouse 계열에서는 제2형 콜라겐을 비자기항원(non-self antigen)으로 잘못 인식함으로써 면역계가 연골을 구성하는 제2형 콜라겐에 대해 면역반응을 수행하여 RA를 유발할 수 있다⁴²⁻⁴⁴. 이러한 실험동물의 RA 모델과 인간의 RA 환자의 공통적인 면역학적 특징으로 혈액 내에 제2형 콜라겐 항체(CAb)가 다량으로 존재한다⁴⁴. 면역관용(immune tolerance) 실패에 의해 생성된 CAb 항체는 연골의 특정 항원결합부위(antigen epitope)에 결합되고, 이어서 이러한 결합을 인식하는 면역세포가 순차적으로 염증반응을 유발하면서 RA가 유발된다⁴. 연골의 특정 부위에 결합된 CAb을 인식하여 초기 염증반응을 유발하는 대표적인 면역세포는 활막 내부에 상주(常駐)하는 활막 대식세포(synovial macrophage)이며, 활막 대식세포가 활성화되어 분비하는 대표적인 염증매개 물질에는 TNF- α , PGE2 등이 있다^{4,7,10,13}. 결합된 CAb에 의해 활성화된 대식세포에서 다량으로 분비되는 TNF- α 는 염증반응의 세기와 기간을 증가하고 파골세포를 활성화시켜 뼈의 손실과 관절의 변형을 유발한다¹³. 한편, 분비된 PGE2는 통증, 발열, 부종 등을 유발한다¹³. RA 환자에 있어서 일반적인 대증요법에 사용되는 비스테로이드성 약물은 염증세포의 COX-2 기능을 저해시켜 PGE2 분비를 억제함으로써 통증, 발열 등을 감소시키고^{14,45}, 심한 RA 병증에 선별적으로 투여되는 항-TNF- α 제제는 체내 TNF- α 양을 감소시켜 염증세포의 염증반응을 완화시키는 효과가 있다¹⁷⁻¹⁹. 종합적으로 대식세포의 활성화 억제와 관련된 항염증 및 진통 효과는 약물을 사용하는 RA 질병 치료에 있어서 우선적으로 고려되어야 한다.

이에 본 연구에서는 SGHHTGB의 항염증 효과를 세포수준에서 평가하기 위해 이 약물이 RAW264.7 대식세포의 활성화에 어떤 영향을 주는지 조사하였다. 세포독성을 나타내지 않는 농도의 SGHHTGB을 대식세포에 처리한 다음 박테리아 내독소로 알려진 LPS를 사용하여 대식세포 활성화를 유도하고, 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)의 생성과 염증성 효소(iNOS/NO 및 COX-2/PGE2)의 발현을 각각 조사하여 약물의 항염증 효과를 평가하였다. SGHHTGB는 활성화된 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 효과적으로 감소시켰다. 또한, iNOS 및 COX-2 발현을 억제함으로써 NO 및 PGE2 생성을 감소시켰다. 일반적인 항염증제가 염증세포의 활성화를 억제함으로써 전염증성 cytokine 및 염증매개 물질의 생성을 감소시키는 점을 고려해볼 때 본 연구에서 관찰된 대식세포의 활성화 억제는 SGHHTGB의 항염증 효과에 의한 것으로 판단된다.

인간과 실험동물에서 RA와 같은 자가면역질환은 외부 감염(infection)에 의해서 질환의 증상이 악화되는 특징이 있다⁴⁶. 이러한 특징을 면역학적으로 bystander 효과라고 하며, 감염원이 T 세포 및 B 세포의 활성화에 관여하기 때문에 나타나는 면역학적인 현상이다⁴⁶. 본 연구에서는 실험동물에서 RA를 효과적으로 유발하기 위해 콜라겐 항체인 CAb을 투여한 후에 감염원의 역할을 담당하는 소량의 LPS를 처리하여 RA 증상을 악화시켰다. 이러한 실험조건에서 SGHHTGB의 RA 개선 효과를 실험동물 수준에서 조사하였다. CAb 항체와 LPS 내독소로 유도된 RA 실험동물 모델에서 SGHHTGB 처리는 RA 질병 활성도 및 발의 부종을 유의하게 감소시켰다. 또한, 병리조직학적 분석결과로부터 SGHHTGB 처리에 의해 염증세포의 침윤(infiltration)이 대조군에 비해 상대적으로 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 관찰결과가 활막 대식세포의 활성화 억제와 관련이 있는지 조사하기 위해 실험동물의 혈액에서 대식세포 주요 생성물인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO, PGE2 양을 각각 측정하였다. 측정결과, SGHHTGB 처리는 혈청 TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO, PGE2 양을 유의하게 감소시켰다.

이상의 관찰결과를 종합해보면 대식세포 염증 모델과 CAb과 LPS로 유도된 RA 실험동물 모델에서 SGHHTGB는 대식세포의 활성화를 억제시키는 항염증 효과를 통해 RA 완화 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 하지만

본 연구의 류마티스 관절염 유도 실험 모델은 15일의 연구만으로 진행되는 단기간의 실험으로, SGHHTGB의 장기 투여가 류마티스 관절염에 지속적으로 미치는 영향을 파악하는 것에는 한계가 있어 추후 진행되는 연구에서 추적 관찰이 가능한 모델로 실험을 설정하여 장기 추적 연구가 필요하리라 생각된다.

결론»»»»

박테리아 내독소(LPS)로 자극된 대식세포 모델 및 제 2형 콜라겐 항체(CAb)와 LPS로 유도된 류마티스 관절염(RA) 실험동물 모델에서 疎經活血湯加味方(SGHHTGB)의 항염증 효과와 관절염 완화 효과를 각각 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포 염증 모델에서 SGHHTGB 처리는 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)의 생성을 억제하였다.
2. 또한 iNOS와 COX-2 염증효소의 발현을 억제하여 NO와 PGE2 염증물질의 분비를 감소시켰다.
3. CAb 항체와 LPS 내독소로 유도된 RA 실험동물 모델에서 SGHHTGB 구강 투여는 관절염을 완화시키고, 발 부종 및 염증세포 침윤을 감소시켰다.
4. 또한 활성화된 대식세포에서 주로 생성되는 혈청 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)과 혈청 염증물질 (NO 및 PGE2)을 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 SGHHTGB은 대식세포 활성화를 억제하는 항염증 효과에 의해 관절염 완화 효과를 나타내는 것으로 판단되며 향후 관련 연구가 진행됨에 따라 임상적으로 류마티스 관절염에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

References»»»»

1. Pap T, Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis - two unequal siblings. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(10):606-15.
2. Tadman J, Hill J. The management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Nurs Times.* 2005;101(2):28-9.
3. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis.

- Lancet.* 2010;376(9746):1094-108.
4. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205-19.
5. Sharif K, Sharif A, Jumah F, Oskouian R, Tubbs RS. Rheumatoid arthritis in review: Clinical, anatomical, cellular and molecular points of view. *Clin Anat.* 2018; 31(2):216-23.
6. Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4): 365-83.
7. Siouti E, Andreacos E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem Pharmacol.* 2019;165: 152-69.
8. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(8):472-85.
9. Tardito S, Martinelli G, Soldano S, Paolino S, Pacini G, Patane M, Alessandri E, Smith V, Cutolo M. Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Autoimmun Rev.* 2019;18(11):102397.
10. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(3):289-95.
11. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656-64.
12. Shim JH, Stavre Z, Gravallese EM. Bone loss in rheumatoid arthritis: basic mechanisms and clinical implications. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(5):533-46.
13. Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2002;4(3):208-17.
14. Del Grossi Moura M, Cruz Lopes L, Silva MT, Barberato-Filho S, Motta RHL, Bergamaschi CC. Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis: Systematic review protocol. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(41):e12658.
15. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, Aslani S. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10018-31.
16. Ferreira JF, Ahmed Mohamed AA, Emery P. Glucocorticoids and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):33-vii.
17. Udalova I, Monaco C, Nanchahal J, Feldmann M. Anti-TNF therapy. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4). doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015.
18. Radner H, Aletaha D. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165(1-2):3-9.
19. Rubbert-Roth A, Atzeni F, Masala IF, Caporali R, Montecucco C, Sarzi-Puttini P. TNF inhibitors in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis: Are they the

- same? *Autoimmun Rev.* 2018;17(1):24-8.
20. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem.* 2018;158:502-16.
 21. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017;389(10086):2338-48.
 22. Evans PJ, Halliwell B. Side-effects of drugs used in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:195-207.
 23. Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che CT, Moudgil KD. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2508.
 24. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. *Korean Medicine Rehabilitation.* 3rd ed. Seoul:Koonja Publisher. 2011:84-6, 98-100.
 25. Zhang ZG. *GeumGueoryakbangron.* Taipei: Daelyengookpyung Publisher. 1973:32-3.
 26. Ju JH. *Danguesimbub.* Seoul:Daesung Publisher. 1982:206.
 27. Kwon JS. *Paresthesia.* Seoul:Jeongdam. 1993:207-8, 214-5, 219-22, 270.
 28. Gong JH. *Manbyeonghoichun.* Seoul:Golimssowon. 1972:5357.
 29. Zhu MS. *Euimunbogam.* Seoul:Golimseowon. 1971:224-7.
 30. Shen JA. *Shenshizunshengshu.* Taipei:Jayu Publisher. 1980:309-17.
 31. Heo J. *Dongyibogam.* Seoul:Namsandang Publisher. 1989:466-72, 365-78.
 32. Kim JH, Rhee HK. An experimental study on the anti-inflammatory and analgesic effects of Sokyunghwalhyel-Tang. *Journal of Korean Medicine.* 1985;6(1):133-9.
 33. Kim KY, Jeong HW, Choi CH, Kim HW, Kim GD, Sim KC, Kim GY. Analgesic effects of Sokyunghwalhyul-tang on constriction nerve injury induced neuropathic pain in rats. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.* 2011;25(2):195-201.
 34. Lee JW, Oh MS. Immunity effect of the Sogyunghwalhyel-tangami in collagen-induced arthritis mice. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.* 2005; 19(5):1323-9.
 35. Kim SJ. Experimental study of Sogyunghwalhyel-tang hap Hwangryunhaedok-tang on the adjuvant arthritis in rats [dissertation]. Daejeon:Daejeon University; 1992.
 36. The College of Korean Medicine Herbal Medicine Common Textbooks Compilation Committee. *Herbal medicine.* Seoul:Younglim Publisher. 2004:725.
 37. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978.
 38. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.
 39. Gencoglu H, Orhan C, Sahin E, Sahin K. Undenatured type II collagen (UC-II) in joint health and disease: a review on the current knowledge of companion animals. *Animals (Basel).* 2020;10(4):697.
 40. Kim WU, Cho ML, Jung YO, Min SY, Park SW, Min DJ, Yoon JH, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Am J Med Sci.* 2004;327(4): 202-11.
 41. Park KS, Park MJ, Cho ML, Kwok SK, Ju JH, Ko HJ, Park SH, Kim HY. Type II collagen oral tolerance; mechanism and role in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19(6): 581-9.
 42. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):469-86.
 43. Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RAD, DeVoss J, Lee WP, Bolon B, Diehl L. Mouse models of rheumatoid arthritis. *Vet Pathol.* 2015;52(5):819-26.
 44. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007;7(1):65-70.
 45. Dionne RA, Khan AA, Gordon SM. Analgesia and COX-2 inhibition. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19(6 Suppl 25):S63-S70.
 46. Sener AG, Afsar I. Infection and autoimmune disease. *Rheumatol Int.* 2012;32(11):3331-8.