

# 관절6호방이 Type II collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향

김현수 · 홍서영 · 허동석 · 오민석\*

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

## Suppressive Effect of Kwanjulbang-6 on Collagen-Induced Arthritis in Mice

Hyun Soo Kim, Seo Young Hong, Dong Seok Heo, Min Suck Oh\*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was carried out to know the effects of Kwanjulbang-6(GJB-6) on the inhibition of arthritis. GJB-6 was orally administered to mouse with arthritis induced by collagen II. Cytotoxicity, hepatotoxicity, arthritis index, value of immunocyte in draining lymph node and paw joint, rheumatoid factor in serum were measured in vivo. The incidence of arthritis was significantly decreased. Total cell number of draining lymph node was significantly increased compared with control. Total cell number of paw joint was significantly decreased compared with control. The absolute number of CD19<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in draining lymph node were significantly increased compared with control. The absolute number of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells in paw joint were significantly decreased compared with control. The absolute number of B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> and MHC II<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cell in draining lymph node were significantly decreased compared with control. The levels of IgG was decreased and The levels of IgM was significantly decreased compared with control. Anti-collagen II in serum was significantly decreased compared with control. With the hematoxylin and eosin stain, the cartilage destruction and synovial cell proliferation were decreased compared with control. With the Masson's trichrome stain, the expression of collagen fibers was decreased compared with control. Results showed that GJB-6 had immunomodulatory effects. So we expect that GJB-6 should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease.

Key words : kwanjulbang-6(GJB-6), collagen induced arthritis, Immune cells

### 서 론

류마토이드 관절염은 대표적인 자가면역성 질환으로서 주로 가동관절을 침범하여 관절의 손상을 초래하는 만성 염증성 질환이다<sup>1)</sup>. 연부조직에 비세균성 만성 염증 반응이 장기간 나타나면 서 연골 파괴, 관절통, 관절 변형, 기능소실 및 발열 등의 관절 증상 외에도 피부발진, 체중감소, 폐, 혈관, 심장, 눈의 염증성 변화 등의 장기 조직의 병변까지 유발하며<sup>2)</sup>, 치료는 완치의 개념보다는 보존적 치료의 입장에서 증세의 증후의 개선에 주안점을 두고 있다<sup>3)</sup>.

한의학적으로 류마토이드 관절염은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 正氣虛弱한 틈을 타고 경락으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 血氣운행을 저해하여 筋骨, 肌肉, 肢體, 關節 등에 疼痛, 酸楚, 重着, 麻木, 腫脹, 屈伸不利 및 關節의 強直性 變形 등을 초래하는 병증으로, 치료는 清熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血 하거나 調榮衛, 養氣血, 補肝腎한다<sup>1)</sup>.

류마토이드 관절염에 대한 실험실적 연구방법은 주로 adjuvant, collagen 등 면역반응을 일으키는 항원 또는 T세포의 활성화 유발제를 이용하여 혈액학적, 혈청학적, 조직학적으로 관찰하는 방법과 면역세포의 표식분자, 개별항체의 탐색, 조직별 염증성 cytokine의 농도 등을 분자생물학적으로 관찰하는 방법으로 대별되는데<sup>4)</sup>, 한의학분야에서도 adjuvant, collagen II로 유발된 관절염 동물모델에 대한 단미제<sup>5)</sup>와 복합방<sup>6)</sup>등의 약물 연구와

\* 교신저자 : 오민석, 대전시 서구 둔산동 1136, 대전대학교 둔산한방병원  
· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 042-470-9136  
· 접수 : 2009/07/14 · 수정 : 2009/07/28 · 채택 : 2009/07/28

침구<sup>7)</sup>, 전침<sup>8)</sup> 및 약침<sup>9)</sup>을 활용한 연구들이 혈청학, 조직학 및 면역학적 관점에서 시행되고 있다.

관절6호방은 임상적으로 류마티오이드 관절염을 치료하기 위하여 行血및 舒筋活絡하는 鷄血藤<sup>10)</sup>, 祛風濕하는 豨薟草, 防風<sup>10)</sup>, 溫經通脈하는 桂枝<sup>10)</sup>, 滋陰降火하는 知母<sup>10)</sup>, 清熱涼血, 養血生津하는 生地黃<sup>10)</sup>, 散寒除濕하는 附子, 麻黃<sup>10)</sup> 등으로 구성된 저자의 창안방이다.

이에 저자는 류마티오이드 관절염에 대한 관절6호방의 효과를 실험적으로 규명하고자, Type II collagen으로 유발된 류마티오이드 관절염 동물모델을 이용해서 관절염 발병률, 관절염 지표, 면역글로불린, anti-collagen II, 조직학적 변화 및 면역세포의 수 등을 측정할 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 플라시인터내셔널(England)에서 분양받은 6주령의 DBA/1J 마우스 32마리를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0 ± 2℃, 1일중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 식이는 고형사료(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 관절6호방(이하 GJB-6로 표기함) 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Gwanjulang-6(GJB-6)

Herb Name	Pharmacognostic nomenclatures	Amount(g)
鷄血藤	<i>Spatholobi caulis</i>	12
豨薟草	<i>Siegesbeckiae herba</i>	8
桂枝	<i>Cinnamomi ramulus</i>	7.5
防風	<i>Saposhnikovia radix</i>	7.5
知母	<i>Anemarrhenae rhizoma</i>	7.5
生地黃	<i>Rehmanniae radix</i>	7.5
白朮	<i>Atractylodis rhizoma white</i>	7.5
白芍藥	<i>Paeoniae radix alba</i>	5.625
附子	<i>Aconiti lateralis preparata radix</i>	3.75
麻黃	<i>Ephedrae herba</i>	3.75
枳實	<i>Aurantii immaturus fructus</i>	3.75
甘草	<i>Glycyrrhizae radix</i>	3.75
Total amount		70.625

### 2. 방법

#### 1) 시료 추출

GJB-6 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 mL을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 rotary vacuum evaporator로 농축하였다. 이를 다시 freeze dryer를 이용하여 완전 건조한 후, 1첩당 23.5 g을 얻어 냉동(-84℃) 보관하

면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 안전성 검사

##### (1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 Human fibroblast cells(hFCs)로 SRB assay 법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 자란 것을 trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10<sup>4</sup>개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GJB-6(최종 농도 500, 250, 125, 62.5, 31.25 μg/mL)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μL를 가하여 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 이후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액(1% acetic acid 용액의 0.4% 용액) 100 μL를 가하고, 실온에서 30 분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM tris base(100 μL)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 흔들 어 준 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### (2) 간 기능 측정

실험 종료 후 심장 채혈을 통해 혈액을 취하였다. 혈액을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리한 후, 혈액 생화학 분석기를 사용하여 ALT, AST를 측정하였다.

#### 3) Collagen 유발 관절염(CIA) 생쥐 모델

Collagen 유발 관절염(CIA)은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 μL를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동탕을 피하주사로 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 DBA/1 J 생쥐 8마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, MTX를 투여한 MTX군과 GJB-6 약물 투여군으로 나누어 실험을 실시하였다.

#### 4) 시료 투여

DBA/1J 생쥐 8 마리를 한 군으로 하여 정상군(이하 Normal), 치료제를 처리하지 않은 대조군(이하 CT), 그리고 양성 대조군 MTX(0.3 mg/kg) 투여군(이하 MTX), GJB-6(9.7 mg/day)투여군(이하 GJB-6)으로 나누어 booster 한 후, 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX(0.3 mg/kg)를 매일 1회 각각 0.1 mL 씩 복강에 주사하였으며, GJB-6 실험군은 9.7 mg/day 농도로 4주 동안 매일 오전 11시에 경구 투여하였다.

#### 5) Arthritis index(AI) 분석

Type II collagen으로 boosting 후 DBA/1J 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율(Incidence, %)을 결정하고, CIA 유발 정도를 1주일에 1회씩 검사하였다(Table 2).

#### 6) Draining lymph node(DLN), paw joint의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 DLN 및 paw joint를 적출하였다. DLN은 100 mesh로 세포를 분리한 후 D-PBS로 5분

간 원심분리(1,700 rpm) 하여 2회 세척한 후 cell strainer에 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 배양기(180 rpm, 20 min.)에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

Table 2. Arthritis score

Score	manifestation
Degree 0	No arthritis
Degree 1	Small degree of arthritis
Degree 2	Light swelling
Degree 3	Medium swelling
Degree 4	Severe swelling

7) 형광 유세포 분석

총 세포수 측정에서 나타난 바와 같이, 상층액을 회수하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, PE-anti-CD19, PE-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, PE-anti-CD23, PE-anti-CD44, FITC-anti-B220를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 DLN, paw joint에서의 절대 세포수를 산출하였다.

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

4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자 방법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IgG와 IgM을 kit로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 µl(1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척하였다. 여기에 HRP-conjugated Avidin 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 재세척하였다. 다시 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 혈청 내 collagen II 항체 농도 측정

CII 항체의 혈청 내 농도 측정은 CIA 실험 종료 후 collagen II kit로 측정하였다 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 µl(1/200 dilution)씩 분주하고, 12시간 동안 4°C 냉장실에 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 biotin-conjugated를 넣고 30분간 방치하였다. 이를 2회 수세 후 완충 용액으로 세척한 다음 HRP-conjugated Avidin 100 µl를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고, 암소에서 30분간 방치한 후 100 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 병리 조직 검사

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GJB-6을 투여하고, 실험 종료 후 각 실험군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에

고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세하였다. 이를 epoxy에 포매한 후 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 수행하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다. 또한 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다.

11) 통계처리

실험결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며 p<0.05 이하에서 유의성을 검증하였다(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 정상군의 세포생존율이 100 ± 5.8(%)로 나타난 반면, GJB-6의 500, 250, 125, 62.5, 31.25(µg/ml) 농도 투여군에서는 각각 82.5 ± 3.8, 88.5 ± 2.9, 92.2 ± 4.1, 95.4 ± 3.8, 104.6 ± 3(%)로 나타났다(Fig. 1).

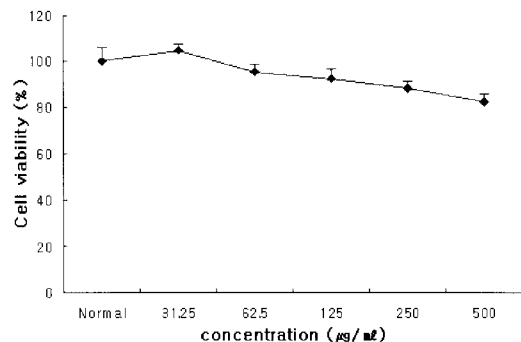


Fig. 1. Cytotoxicity of GJB-6 on human fibroblast cells.

2. 간 기능에 미치는 영향

ALT에서는 정상군이 37.3 ± 2.4, 양성대조군이 30.3 ± 1.6으로 나타났으며 GJB-6 투여군에서는 30.4 ± 1.0으로 나타나 유의성이 없었다. AST는 정상군이 101.1 ± 2.1, 양성대조군이 109.4 ± 4.6으로 나타났으며 GJB-6 투여군에서는 119.2 ± 10.2로 나타나 유의성이 없었다.

3. 관절염 유발물에 미치는 영향

관절염 유발물을 매주 1회 검사한 결과, 시료 투여부터 MTX 투여군과 GJB-6 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 감소함을 보였고, 3주부터는 MTX 투여군과 GJB-6 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 GJB-6 투여군에서 감소를 나타내었으며, 4주에도 대조군에 비하여 GJB-6 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2).

4. DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향

DBA/1J mice에 4주간 GJB-6을 경구 투여한 후 DLN 및 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, DLN에서는 정상군이  $6.5 \pm 1.60(\times 10^6)$ , 대조군이  $1.57 \pm 0.24(\times 10^6)$ , MTX 투여군이  $4.96 \pm 1.26(\times 10^6)$ , GJB-6 투여군이  $6.0 \pm 1.0(\times 10^6)$ 로 나타나, 이 역시 대조군에 비하여 GJB-6 투여군에서 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3). Paw joint에서는 정상군이  $5.1 \pm 0.9 (\times 10^6)$ , 대조군이  $24.3 \pm 2.7(\times 10^6)$ , MTX 투여군이  $12.9 \pm 0.3(\times 10^6)$ , GJB-6 투여군이  $15.6 \pm 2.8(\times 10^6)$ 로 나타나 대조군에 비하여 GJB-6 투여군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

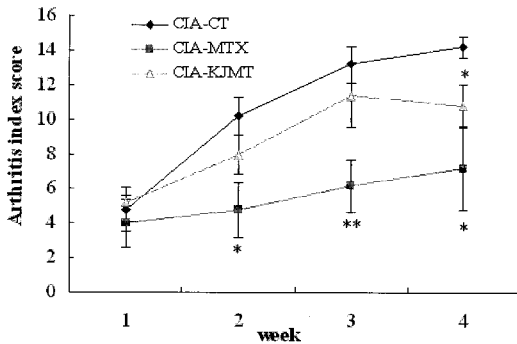


Fig. 2. Suppressive effect of GJB-6 on arthritis index of paw joint in CIA mice.

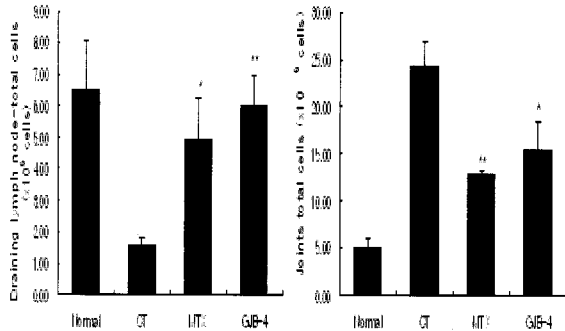


Fig. 3. Effect of GJB-6 on total cell number of DLN and paw joint in CIA mice.

5. 면역세포에 미치는 영향

1) DLN 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD19<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD19<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $19.1 \pm 6.5(\times 10^4)$ , 대조군이  $6.4 \pm 1.1(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $14.1 \pm 3.5(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $24.9 \pm 3.8(\times 10^4)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 GJB-6 투여군에서 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(2) CD3<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $43.8 \pm 7.8(\times 10^4)$ , 대조군이  $7.7 \pm 1.4(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $30.6 \pm 5.6(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $33.8 \pm 3.6(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(3) CD4<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD4<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $31.7 \pm 7.3(\times 10^4)$ , 대조군이  $4.5 \pm 0.4(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $20.9$

$\pm 6.0(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $20.5 \pm 6.1(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effects of GJB-6 on absolute number of CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells in DLN of CIA mice

Group	Normal	Control	MTX	GJB-6
CD19 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	19.1 $\pm$ 6.5	6.4 $\pm$ 1.1	14.1 $\pm$ 3.5*	24.9 $\pm$ 3.8**
CD3 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	43.8 $\pm$ 7.8	7.7 $\pm$ 1.4	30.6 $\pm$ 5.6**	33.8 $\pm$ 3.6***
CD4 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	31.7 $\pm$ 7.3	4.5 $\pm$ 0.4	20.9 $\pm$ 6.0*	20.5 $\pm$ 6.1*
CD3 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	3.9 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 1.1**	3.8 $\pm$ 0.9*
CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	10.9 $\pm$ 2.3	2.1 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 1.4**	6.1 $\pm$ 1.2*
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	10.1 $\pm$ 1.6	1.7 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6***	6.8 $\pm$ 0.2***
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	5.9 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 1.1*	4.1 $\pm$ 0.7**
CD3 <sup>+</sup> /CD49b <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	2.1 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 0.1***	1.5 $\pm$ 0.4*
CD4 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	18.3 $\pm$ 4.7	2.7 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 2.6**	13.1 $\pm$ 1.2**
B220 <sup>+</sup> /CD23 <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	8.0 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 1.6	12.9 $\pm$ 0.8*	11.6 $\pm$ 0.6**
MHC II <sup>+</sup> /CD11c <sup>+</sup> ( $\times 10^4$ )	1.46 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.4*

(4) CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $3.9 \pm 1.4(\times 10^4)$ , 대조군이  $1.6 \pm 0.1(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $5.1 \pm 1.1(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $3.8 \pm 0.9(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(5) CD8<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD8<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $10.9 \pm 2.3(\times 10^4)$ , 대조군이  $2.1 \pm 0.8(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $8.3 \pm 1.4(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $6.1 \pm 1.2(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(6) CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $10.1 \pm 1.6(\times 10^4)$ , 대조군이  $1.7 \pm 0.3(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $7.7 \pm 0.6(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $6.8 \pm 0.2(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(7) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $5.9 \pm 1.5(\times 10^4)$ , 대조군이  $1.2 \pm 0.1(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $3.5 \pm 1.1(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $4.1 \pm 0.7(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(8) CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $2.1 \pm 0.5(\times 10^4)$ , 대조군이  $0.5 \pm 0.0(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $3.8 \pm 0.1(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $1.5 \pm 0.4(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(9) CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이  $18.3 \pm 4.7(\times 10^4)$ , 대조군이  $2.7 \pm 0.2(\times 10^4)$ , MTX 투여군이  $13.0 \pm 2.6(\times 10^4)$ , GJB-6 투여군이  $13.1 \pm 1.2(\times 10^4)$ 로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

(10) B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 8.0 ± 0.1(×10<sup>4</sup>), 대조군이 17.7 ± 1.6(×10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 12.9 ± 0.8(×10<sup>4</sup>), GJB-6 투여군이 11.6 ± 0.6(×10<sup>4</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 3).

(11) MHCII<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 세포 발현

DLN에서 MHCII<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 세포수를 절대 세포수로 산출한 결과, 정상군이 1.46 ± 0.1(×10<sup>4</sup>), 대조군이 2.8 ± 0.7(×10<sup>4</sup>), MTX 투여군이 1.7 ± 0.7(×10<sup>4</sup>), GJB-6 투여군이 0.7 ± 0.4(×10<sup>4</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 3).

2) Paw joint 내 면역세포에 미치는 영향

(1) CD3<sup>+</sup> 세포 발현

Paw joint에서 CD3<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과 정상군이 1.0 ± 0.3(×10<sup>5</sup>), 대조군이 31.1 ± 2.0(×10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 4.6 ± 0.5(×10<sup>5</sup>), GJB-6 투여군이 14.1 ± 1.3(×10<sup>5</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

(2) CD4<sup>+</sup> 세포 발현

Paw joint에서 CD4<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과 정상군이 0.3 ± 0.1(×10<sup>5</sup>), 대조군이 19.5 ± 0.5(×10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 2.1 ± 0.2(×10<sup>5</sup>), GJB-6 투여군이 10.4 ± 2.4(×10<sup>5</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

(3) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 발현

Paw joint에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과 정상군이 0.74 ± 0.2(×10<sup>5</sup>), 대조군이 2.41 ± 0.1(×10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 2.34 ± 0.2(×10<sup>5</sup>), GJB-6 투여군이 1.2 ± 0.2(×10<sup>5</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

(4) CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포 발현

Paw joint에서 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포수를 절대세포수로 산출한 결과, 정상군이 1.6 ± 0.2(×10<sup>5</sup>), 대조군이 126.4 ± 1.6(×10<sup>5</sup>), MTX 투여군이 47.8 ± 3.5(×10<sup>5</sup>), GJB-6 투여군이 63.8 ± 2.8(×10<sup>5</sup>)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Table 4).

Table 4. Effects of GJB-6 on absolute number of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> cells in paw joint of CIA mice

Group	Normal	Control	MTX	GJB-6
CD3 <sup>+</sup> (×10 <sup>5</sup> )	1.0 ± 0.3	31.1 ± 2.0	4.6 ± 0.5***	14.1 ± 1.3***
CD4 <sup>+</sup> (×10 <sup>5</sup> )	0.3 ± 0.1	19.5 ± 0.5	2.1 ± 0.2***	10.4 ± 2.4**
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> (×10 <sup>5</sup> )	0.74 ± 0.2	2.41 ± 0.1	2.34 ± 0.2	1.2 ± 0.2*
CD11b <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> (×10 <sup>5</sup> )	1.6 ± 0.2	126.4 ± 1.6	47.8 ± 3.5***	63.8 ± 2.8***

6. Rheumatoid factor(RF)에 미치는 영향

1) IgG 혈중 농도

IgG 혈중 농도는 정상군이 8.6 ± 4.0(mU/ml), 대조군이 207.3 ± 43.7(mU/ml), MTX 투여군이 106.0 ± 20.3(mU/ml), GJB-6 투여군이 141.8 ± 10.2(mU/ml)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

2) IgM 혈중 농도

IgM 혈중 농도는 정상군이 8.3 ± 3.1(mU/ml), 대조군이 36.9 ± 2.5(mU/ml), MTX 투여군이 31.2 ± 4.3(mU/ml), GJB-6 투여군이 21.1 ± 5.7(mU/ml)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

7. 혈청내 collagen II 항체량 측정

Collagen II 항체량은 정상군이 1.1 ± 0.0(U/ml), 대조군이 41.7 ± 0.9(U/ml), MTX 투여군이 24.0 ± 2.5(U/ml), GJB-6 투여군이 29.0 ± 2.0(U/ml)로 나타나, GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 4).

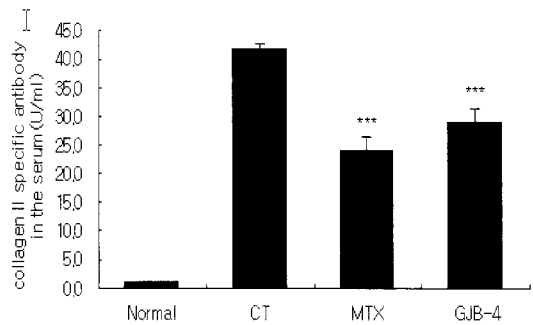


Fig. 4. Effects of GJB-6 on levels of collagen II specific antibody in the serum of CIA mice.

8. 조직학적 변화

1) Hematoxylin & Eosin 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GJB-6을 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색을 통하여 염증의 침윤과 macrophage, granulocytes, mononuclear cell, pro-inflammation synoviocytes 그리고 활막세포의 hyperplasia에 침투 정도를 분석하였다. Fig. 5B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직의 염증이 진행되었다. 반면, MTX 처리군 (Fig. 5C), GJB-6(9.7 mg/day) (Fig. 5D) 투여군에서는 대조군에 현저하게 관찰된 족부 (paw)의 윤활관절강(JC)에서의 염증을 관찰할 수 없어 상대적으로 감소하였다 (Fig. 5).

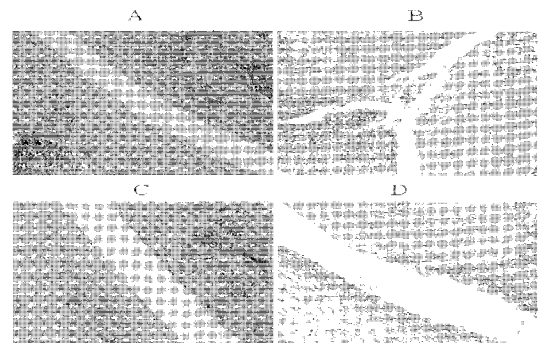


Fig. 5. Histological section of paw joints from CIA mice. Normal (A) : Normal DBA/1J mouse group CT (B) : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection MTX (C) : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and 0.3 mg/kg I.P injection GJB-6 (D) : DBA/1J mouse group with collagen S.C. injection and 9.7 mg/day/0.2 ml oral treated were analysis with histopathology of paw joints of Murine CIA. original magnifications: × 200

2) Masson-Trichrome 염색

CIA 생쥐 모델에 4주간 MTX, GJB-6을 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 통하여 활막의 파괴, 혈관의 확장, 연골 판누스 결합 조직 등을 분석하였다. Fig. 6B는 CIA의 대조군으로 CII로 유발된 관절조직에 collagen 침착이 진행되었고, 반면, MTX 처리군(Fig. 6C), GJB-6(9.7 mg/day)(Fig. 6D) 투여군에서는 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다(Fig. 6).

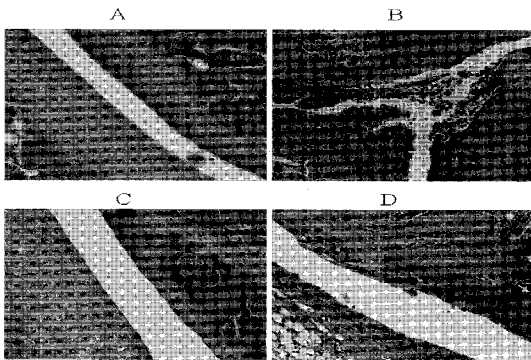


Fig. 6. Histological section of paw joints from CIA mice. A(Normal). B(CI). C(MTX). D(GJB-6).

고찰

류마티오이드 관절염은 지속적인 염증성 활막염이 말초관절에 대칭적으로 침범하는 것을 특징으로 하는 대표적인 자가 면역성 질환으로 만성적인 경과를 밟으며 증상의 완화와 악화가 반복되는 경우가 대부분이다<sup>1)</sup>.

류마티오이드 관절염은 면역계통과 관련되어 다발성 관절염을 일으키는 만성 전신성 염증성 질환이며 유병률은 인구의 0.3-2.1% 정도로 퇴행성 관절질환 다음으로 흔하고 전 세계의 모든 인종에서 나타날 수 있는데 최근에는 유전적 요소가 많이 나타나는 자가 면역 질환의 일종으로 생각되고 있다<sup>3)</sup>.

이 질환에서는 연골 파괴, 관절통, 관절 변형, 기능소실, 및 발열 등의 관절 증상뿐만 아니라 피부발진, 체중감소, 폐, 혈관, 심장, 눈의 염증성 변화 등의 장기 조직의 병변까지 유발하는 전신성 질환을 유발한다<sup>2)</sup>.

류마티오이드 관절염을 일으키는 원인 물질들에 관하여 확실히 규명된 바는 없으나 EBV, Mycobacteria 및 Type II Collagen 등의 활막염 발생을 유발할 수 있는 원인 인자들과 class II 유전자(HLA-D: Human Leukocyte antigen-D) 등의 유전 면역학적 숙주인자들, 그리고 활막의 B 세포에 의한 체액성 면역반응, 활액 조직내 T 세포에 의한 세포성 면역반응, ICAM, VCAM, VLA, LFA 등의 유착분자, IL-1, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\beta$  등의 cytokine 과 같은 숙주의 면역 반응 인자들로 인해 발생하는 것으로 추정되고 있다<sup>11)</sup>.

류마티오이드 관절염의 면역학적 기전을 구체적으로 살펴보면 활막에 T세포, 대식세포, 활막세포 등이 출현함이 특징이고,

single-cell lining을 pannus라 부르는 총혈된 염증세포로 비꾼다. pannus안에서 염증, 증식, 체액성 및 세포성 면역반응이 연골과 결합조직을 파괴시키는 Metalloprotease과 다른 매개체의 방출을 유도한다. 이 중 특히 CD4<sup>+</sup> T세포가 중요하다. 류마티오이드 관절염은 MHC class II HLA항원과의 연관성이 가장 크며, MHC class II의 주된 기능은 CD4<sup>+</sup> T세포에 항원성 펩타이드를 나타낸다<sup>12,13)</sup>.

활성화된 CD4<sup>+</sup> T세포는 단핵구, 대식세포, 활막섬유세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 를 생산하고, 조직을 파괴하는 Matrix Metalloprotease(MMP)를 분비한다. 즉 류마티오이드 관절염에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막연접부의 침식에 의해 발생하며, 이는 주로 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 염증유발 cytokine에 반응한 대식세포나 섬유세포에 의해 생산되는 MMPs에 의해 파괴된다. MMP, 특히 stromelysin(MMP-3)과 collagenase(MMP-1)은 결합 조직의 기질을 파괴시키고, 류마티오이드 관절염에서 관절손상의 주된 매개체로 생각되는 enzyme이다. 또한 활성화된 CD4<sup>+</sup> T세포는 osteoclastogenesis를 자극하여, IL-1, TNF- $\alpha$ 와 독립적으로 관절손상을 일으킨다<sup>13)</sup>.

치료는 보존적 치료, 약물치료, 수술적 치료로 나눌 수 있는데 보존적 치료 즉 기초요법은 적절한 영양공급과 안정, 휴식, 유발요인에 대한 처치, 물리치료 등을 실시하며, 약물치료는 부신 피질호르몬, 아스피린과 비스테로이드성 항염증제, 항류마티오이드제 등을 사용하며 이상의 치료에도 불구하고 관절의 통증, 관절의 종창, 구축, 신경증세가 출현하거나 진행되면 외과적 수술을 시행하고 있으나<sup>14)</sup>, 각각은 골수부전, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아<sup>15)</sup> 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

류마티오이드 關節炎은 韓醫學의으로 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛風, 痺症, 風痺, 類風濕性關節炎 等の 範疇에 屬한다고 볼 수 있다. 이 중에서 痺症은 가장 包括的인 의미로 諸般 感覺 運動障礙를 總稱하며, 歷節風은 그 症狀이 류마티오이드 關節炎과 가장 類似하다<sup>16)</sup>.

痺症의 概念을 《黃帝內經》<sup>17)</sup>에서는 “痺者痛也”라 하였으며, 《黃帝內經 素問·五藏生成論》<sup>17)</sup>에 “臥出而風吹之 血凝於膚者爲痺”라고 하였고, 《黃帝內經 素問·痺論》<sup>17)</sup>에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 痺는 風寒濕의 三邪가 經絡에 阻滯되어 氣血이 不暢하게 되니 臨牀的으로 筋骨, 肌肉關節 등에 疼痛, 酸脹, 重着, 麻木, 關節의 腫大, 屈伸不利의 症狀를 隨伴하게 되는 것이다.

痺症의 原因에 대하여 《金匱要略》<sup>18)</sup>에서 “短氣自汗出歷節疼不可屈伸此皆飲酒汗出當風所致”라 하여 飲酒汗出·風邪을, 《巢氏諸病源候論》<sup>19)</sup>에서 “由人體虛 腠理開 故受風邪也”라 하여 體虛·風邪를, 《東垣十種醫書》<sup>20)</sup>에서 “彼痛風者 因血受熱 已自沸騰 其後 或涉冷水 或立濕地 或扇取涼 或臥當風 寒涼外搏 熱血 得寒 汚濁凝滯 所以作痛”이라 하여 血熱을 痺症의 주된 原因이라 하였고, 《醫學入門》<sup>21)</sup>에서 “痛風……形杖瘦者 多內因 血虛有火 形肥勇者 多外因 風濕生痰 以其循歷遍身 曰歷節風 甚如虎咬 曰白虎風”, “痛多痰火 腫多風濕然”, “鶴膝風……三陰虧

損風邪入亦有虛火陰血枯所以病後多此疾.”이라 하여 痛風·關節風·白虎風·鶴膝風의 原因을 內因, 外因으로 說明하였다.

이를 요약해보면 류마티드 관절염은 筋骨, 肌肉, 肢體, 關節 등에 疼痛, 酸楚, 重着, 麻木, 腫脹, 屈伸不利 및 關節의 強直性 變形 등을 초래하는 병증으로, 原因은 風寒濕, 熱, 瘀血, 氣血虛, 陽虛, 陰虛 등이며 治法은 清熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血 하거나 調榮衛, 養氣血, 補肝腎한다<sup>1)</sup>.

관절6호방은 鷄血藤 12 g, 豨薟草 8 g, 白芍藥 5.625 g, 桂枝, 防風, 知母, 生地黃, 白朮 각 7.5 g, 附子, 麻黃, 枳實, 甘草 각 3.75 g으로 구성되었는데, 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하는 효능이 있으며<sup>10)</sup> 류마티드 관절염 환자의 활막세포와 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염 억제에 효과가 있음이 보고 되었다<sup>22,23)</sup>. 豨薟草는 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒하는 효능이 있는데<sup>10)</sup> 염증성 cytokine 및 류마티드 관절염에 효과가 있으며<sup>24)</sup> 防風은 勝濕止痛하는 효능이 있으며<sup>10)</sup> 鎮痛, 消炎, 解熱, 鎮痙의 효과가 있음이 보고 되었다<sup>25)</sup>. 知母는 滋陰降火 潤燥滑腸하며<sup>10)</sup> 消炎, 鎮痛작용이 있으며<sup>26)</sup> 麻黃은 發汗散寒하며<sup>10)</sup> 면역조절에 효과가 있음이 보고되었다<sup>27)</sup>. 또한 附子는 回陽補火 散寒除濕하며<sup>10)</sup> 鎮痛 및 消炎 작용이 있어 임상적으로 류마티드 관절염에 많이 활용되고 있다<sup>28)</sup>.

이에 저자는 관절6호방의 류마티드 관절염에 대한 치료 효과를 실험적으로 규명하고자, Type II collagen으로 유발된 류마티스 관절염 동물모델을 이용해서 관절염 발병률과 관절염 지표, 면역글로불린 및 anti-collagen II, 조직학적 변화 및 면역세포의 수에 미치는 영향 등을 연구하여 류마티드 관절염의 억제와 면역조절에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 실험에서 hFCs에 대한 세포독성에서는 세포생존율이 GJB-6 농도 31.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 104.6  $\pm$  3%로 가장 높았다(Fig. 1). 본 실험에서 간 기능에 미치는 영향에서는 대조군과 비교하여 유의성이 없어 간 기능에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

본 실험에서 관절염 유발물은 4주째에 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

본 실험에서 DLN 및 paw joint 내 총 세포수에 미치는 영향에서는 DLN에서는 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가한 반면 Paw joint에서는 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3). 또한 DLN에서 GJB-6 투여군은 정상 쥐와 비슷한 세포수를 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

위의 결과는 GJB-6 투여군이 DLN에서 이러한 면역 세포의 불균형을 조절하여서 정상 쥐와 비슷한 세포수를 유지하며 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

면역초기에 T세포는 CD9, CD10 등을 가지고 있으나, 세포가 성숙하면서 CD4, CD3, CD8 등을 얻게 되며, 성숙된 흉선세포는 두 개의 종류로 분리되는데, CD4와 CD8이다. CD4<sup>+</sup> T세포는 보조 T세포이고, CD8<sup>+</sup> T세포는 억제 T세포 또는 세포독성 T세포로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 細分하는 表式因子로 이용되고 있으나 모든 T세포 表面에 表現되는 表式因子로 CD3<sup>+</sup>가 있으며 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다<sup>29)</sup>.

CD3e세포는 T세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 있으며 항원인식 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 하고, CD19세포는 B세포의 수를 측정하는데 주로 사용하며, 항체를 직접 생산하여 외부물질을 중화시키는 체액성 면역반응에 관여한다<sup>30)</sup>.

CD69는 휴지기 림프구에서는 발현되지 않지만, T세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화자로 불리는 세포표면 단백질이며, 활성화된 T세포 및 B세포, 대식세포, NK세포에서도 발현이 된다. T세포와 내피세포 간의 상호작용에 있어서 T세포를 활성화시키는데 CD69같은 다양한 표면표시인자들의 발현이 증가된다<sup>31)</sup>.

본 실험에서 DLN내 CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 또한 Paw joint내 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 3, 4).

위의 결과는 GJB-6 투여군이 DLN에서 증가하는 경향을 보여 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 GJB-6 투여군이 paw joint에서 감소하는 경향을 보여 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제하는 것으로 보인다.

최근 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T세포는 자가 특이 T세포의 활성을 능동적으로 억제하여 자가면역반응이 정상적인 면역반응을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 이를 면역조절T세포(regulatory T)라 한다<sup>32)</sup>. B 세포에서는 높은 수준의 CD44<sup>+</sup> 세포가 나타나며 이러한 CD44<sup>+</sup> 세포는 DLN 조직들이 제자리를 찾아오게 하는 중간에 반응하는데 그 표면에서 반응 한다<sup>4)</sup>. 또한 CD49b<sup>+</sup> 세포는 자가 항원에 감작된 미성숙 수지상 세포에 의해서 활성화 되고 증식되는 조절 T세포로서 RA와 같은 자가 면역성 질환의 억제 작용을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>33)</sup>.

CD23<sup>+</sup> 세포는 알레르기 비염이나 알레르기 천식등 알레르기 질환에서 IgE 생성 및 염증반응에 연관된다. 항원에 의해 유도되는 IgE 합성이 알레르기 질환의 중심적 양상이고, 뒤따르는 IgE와 항원의 상호작용은 알레르기에 연관된 증상과 관계있다. IgE 생성은 다양한 활성을 보이는 세포표면분자 CD23에 의해 조절된다. CD23을 통한 allergen-loaded IgE에 의해 세포들이 활성화되면 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 가 생성 된다<sup>34)</sup>. B220<sup>+</sup> 세포는 사람에게는 없지만 mouse의 B세포 표면에 있는 표식자이다<sup>29)</sup>.

본 실험에서 DLN내 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>세포 발현을 측정한 결과 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하고 B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 또한 Paw joint내 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 3, 4).

위의 결과는 GJB-6 투여군이 DLN에서 증가하며 paw joint에서 감소하는 것으로 보아 GJB-6의 투여가 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 보인다. CD11a는 백혈구에서 발현되고, CD18과 짝을 이루며 부착과 세포의 이동작용을 한다. CD11b<sup>+</sup>는 단핵세포, 과립구, NK 세포에서 발현되는 세포표면분자로서, 이 세포들은 염증시에 제일 먼저 도착하는 혈구들로 신체에 침투한

항원에 대한 탐식작용을 하며 류마티드 관절염 환자의 활막조직에서는 염증반응으로 인하여 CD11b<sup>+</sup>의 발현이 증가된다<sup>35)</sup>. CD11c<sup>+</sup>는 사이토카인의 생성을 차단한다고 알려져 있다<sup>36)</sup>.

본 실험에서 MHCII<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 세포 발현을 측정할 결과 DLN에서 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 3).

본 실험에서 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포 발현을 측정할 결과 paw joint에서 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

위의 결과는 관절염이 발생한 관절 조직에서는 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포의 수가 급격하게 감소한 것으로 보아 GJB-6이 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제하는 것으로 보인다.

전형적인 류마티드 관절염 환자의 B 림프구는 혈청이나 관절 내에서 자가 항체인 IgG, IgM 등과 항원에 따른 항체를 분비하며, 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로불린의 Fc부위에 대한 자가 항체인 류마티드 인자를 생성한다. 일단 IgG와 RF가 항원 항체 복합물을 형성하면 보체를 활성화시키는 화학매개물이 방출되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활막세포 파괴와 염증반응을 일으킨다<sup>37)</sup>. 특히 B림프구의 표면에서 방출되는 IgG anti-collagen 항체는 제 II형 collagen에 대한 특이반응을 보이며 이 항체가 증가하는 경우 관절염이 발생하여, 일반적으로 항체정도와 관절염의 심한 정도는 관련이 있어 이를 측정하여 관절염의 객관적 지표로 이용하고 있다<sup>38)</sup>.

본 실험에서 IgG 혈중 농도는 GJB-6 투여군이 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다. IgM 혈중 농도는 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하여, GJB-6에 의하여 면역반응이 억제 조절되었음을 알 수 있었다.

본 실험에서 Collagen II 항체량은 GJB-6 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

Hematoxylin and eosin stain은 조직의 구조를 관찰하기 위한 염색법으로, 이를 이용하여 관절의 조직을 관찰할 결과 GJB-6 투여군에서 대조군에 비하여 연골의 파괴와 활막의 증식이 감소하였다(Fig. 5).

Masson's Trichrome stain은 collagen fiber를 관찰하기 위한 염색으로, 조직학적으로 GJB-6 투여군에서 대조군에 비하여 관절 주변에서의 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 감소하였다(Fig. 6).

이상의 실험결과를 종합하면 관절6호방은 조절 T 세포의 활성화에 영향을 주고 관절염 발생에 중심적인 역할을 하는 T세포 등의 염증 세포의 관절로의 유입을 억제하는 바, 류마티드 관절염 억제 및 치료에 유효한 것으로 사료된다.

## 결 론

관절6호방이 Type II collagen으로 유발된 흰쥐의 관절염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여, 관절염 발병률과 관절염 지표, 면역글로불린 및 Anti-collagen II, 조직학적 변화 및

면역세포의 수 등을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

관절염 유발물은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. DLN에서의 총 세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, paw joint에서의 총 세포수는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. DLN내 CD19<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 및 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. Paw joint내 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 및 CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. DLN내 B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 혈청내 IgG는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었고, IgM은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. Collagen II 항체량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. Paw joint내 Hematoxylin & Eosin 염색에서 대조군에 비하여 연골의 파괴와 활막의 증식이 감소하였다. Paw joint내 Masson-Trichrome 염색에서 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 파괴, collagen 침착 그리고 활막세포의 손상이 감소하였다.

이상의 결과로 관절6호방은 Type II collagen으로 유발된 관절염을 억제하는 것으로 나타났으며 이는 임상적으로 류마티드 관절염 치료에 유효할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울, 군자출판사, pp 78-99, 2005.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학 6판. 서울, 최신의학사, pp 232-247, 2006.
3. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울, 정담출판사, pp 2148-2150, 2006.
4. 유호상. 關節炎에 관한 韓醫學 碩·博 論文 73編에 대한 分析. 대전대학교 대학원, 2001.
5. 송인광, 이승덕, 감갑성. 쥐의 콜라겐 유도 관절염에 대한 楡根皮의 효과 및 기전. 대한침구학회지 24(2):83-100, 2007.
6. 공상은, 오민석. 海桐皮複合方이 Collagen II 유발 관절염에 미치는 실험적 연구. 한방재활의학과학회지 18(2):1-15, 2008.
7. 위통순, 나창수, 윤여충. 刺鍼과 牛黃, 熊膽약침이 백서의 adjuvant arthritis에 미치는 영향에 대한 비교 연구. 대한침구학회지 19(2):164-176, 2002.
8. 박인범, 최병태, 안창범. 전침에 의한 Complete Freund's Adjuvant 유발 관절염모델의 거퇴 paw joint 염증관련 단백질에 대한 면역조직화학적 연구. 대한침구학회지 22(4):55-63, 2005.
9. 이현진, 조현석, 황민섭. 鹿茸약침이 백서의 제2형 Collagen 유발 관절염에서 iNOS 발현과 NO생성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지 25(5):105-116, 2008.
10. 전국 한의과 대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울, 영림사, p 124, 131, 162, 191, 276, 332, 445, 582, 2000.
11. Holmdah, I.R., Jansson, L., Larsson, A., Jonsson, R. Arthritis



- in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum, Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scand J. Immunol.* 31: 147-157, 1990.
12. Gordon, Starkebaum, Rheumatoid, Arthritis. *Science and Medicine.* 5(2):111-123, 1998.
  13. Franklin, H., Epstein. Cytokine pathways and joint inflammation in RA. *N. Eng. J. Med.* 344(12):907, 2001.
  14. 김동휘. 최신진단과 치료. 서울, 약업신문사, pp 634-637, 1992.
  15. 배상철. 류마티스 관절염 치료의 최신 지견. *가정의학회지* 22(1):21-26, 2001.
  16. 張介賓. 景岳全書(上). 서울, 정담, pp 215-220, 1999.
  17. 王琦 外. 黃帝內經 素問今釋. 서울, 醫聖堂, pp 1, 60, 164, 412, 206-211, 1994.
  18. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北, 台聯國風出版社, pp 32-33, 1973.
  19. 巢元方. 諸病源候論. 台北, 人民衛生出版社, p 576, 644, 1979.
  20. 李杲. 東垣十種醫書. 서울, 大成文化社, pp 33, 85-87, 1983.
  21. 李梴. 國譯編註醫學入門(하). 서울, 남산당, pp 204-212, 1996.
  22. 최정식, 송태원. 鷄血藤이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염억제에 관한 연구. *대한본초학회지* 18(3):79-88, 2003.
  23. 서해경, 오민석, 김동희. 류마티스 관절염 환자 활막세포에 대한 鷄血藤의 면역반응. *동의생리병리학회지* 17(3):780-786, 2003.
  24. 조영주. 薜荔이 염증성 사이토카인 및 류마티스양 관절염에 미치는 영향. *大田大學校大醫院*, 2003.
  25. 이종국, 강성길. 防風수침이 진통, 소염, 해열 및 진경에 미치는 영향. *대한침구학회지* 3: 11-23, 1986.
  26. 김순신, 김혜경, 최종원. 桂芍知母湯의 소염, 진통 작용 및 Alcohol성 고뇨산혈증에 미치는 영향. *생약학회지* 26(1):66-73, 1995.
  27. 송형근, 이현. 麻黃약침의 천식억제 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지* 23(1):46-55, 2006.
  28. 정선희. 附子약침이 진통 및 소염작용에 미치는 영향. *대한침구학회지* 14(1):334-346, 1997.
  29. 김세중. 면역학. 서울, 고려의학, pp 18, 134, 148-150, 1994.
  30. 타다 토미오. 면역의 의미론. 서울, 한울, p 46, 103, 1998.
  31. Ziegler, S.F. The activation antigen CD69. *Stem Cells.* 12(5):456-465, 1994.
  32. Gavin, Ma., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A. Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol.* 3: 33-41, 2002.
  33. Charbonnier, L.M., Duivenvoorde, L.M. and Apparally, F. Immature dendritic cell suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b<sup>+</sup> regulatory T cell. *J Immunol.* 177: 3806-3813, 2006.
  34. Lanny, J., Rosenwasser, William, W., Busse, Richard, G., Lizambri Teresa, A. Olejnik and Mark C. Totoritis. Allergic asthma and an anti-CD23mA. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 563-570, 2003.
  35. Thirumalai Ramalingam. Kinetics of Cellular Responses to Intraperitoneal *Brugia pahangi* Infections in normal and Immunodeficient Mice. *Infection And Immunity.* pp 4361-4367, 2003.
  36. 박소영, 강대영. CD11c항체가 Lipopolysaccharide에 의한 국소적 Shwartzman 반응의 유발에 미치는 영향. *충남의대잡지*, 27(2):169-182, 2000.
  37. 김세윤. 류마티스 진료. 서울, 군자출판사, p 219, 2001.
  38. Cremer, M.A., Rosloniec, E.F., Kang, A.H. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 76(3-4):275-288, 1998.