

# 상지가 콜라겐 유발 관절염 랫트에 미치는 영향 - 배액림프절의 면역세포 발현 -

노성수 · 구세광<sup>1</sup> · 서영배<sup>2\*</sup>

대구한의대학교 한의과대학 본초학연구실, 1: 해부조직학교실, 2: 대전대학교 한의과대학 본초학교실

## Effects of Mori Ramulus on Collagen-induced Arthritis Rat - Expression of Immunocells in Draining Lymph Node -

Seong Soo Roh, Sae-Kwang Ku<sup>1</sup>, Young Bae Seo<sup>2\*</sup>

Laboratory of Herbology, 1: Department of Anatomy & Histology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,  
2: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Mori Ramulus has multiple applications in Korean traditional medicine prescription because it has antioxidant and anti-inflammatory effects by reducing macrophage activities. Yet, no studies on the anti-arthritis activity of EMR (extract of Mori Ramulus) have been reported in vitro and in vivo. Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease with chronic inflammation characterized by hyperplasia of synovial cells in affected joints, which ultimately leads to the destruction of cartilage and bone. Because collagen-induced arthritis (CIA) is similar to RA in pathological symptoms and immune reactions, there have been several reports concerning RA using CIA mouse model. Here, we investigated the effects of Mori Ramulus on RA using CIA mice. The importance of CD4+ Th1 cells in RA progress was previously indicated and studies further showed that Th17 cells play a prime role in severity of disease. Accordingly, the present study was focused on CIA associated with CD4+ Th1 cells and Th17 cells. DBA/10LaHsd mice were immunized with bovine type II collagen (CII). After a second collagen immunization, mice were treated with EMR once a day for 4 weeks. The severity of arthritis within the paw joints was evaluated by histological assessment of cartilage destruction and pannus formation. Immune cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), draining lymph node (DLN) and paw joints, cytokine production and gene expression were assessed from CIA mouse using ELISA, FACS and real-time PCR analysis. Administration of EMR significantly suppressed the progression of CIA and inhibited the production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 in the serum. The erosion of cartilage was dramatically reduced in mouse knees after treatment with EMR. In conclusion, our results demonstrate that EMR significantly suppressed the progression of CIA and that this action was mediated by the decreased production of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 and collagen II-specific antibody in the serum. EMR suppressed Th17 cells and reduced level of IL-6 via B cell suppression, and thus, the levels of autoantibodies produced from B cells were decreased. Furthermore, EMR suppressed NKT cells which directly stimulate B cells and develop imbalance of Th1/Th2 cell. Oral administration of EMR (100 mg/kg or 200 mg/kg) significantly suppressed the progression of CIA, which is comparable to that of methotrexate (MTX, 0.3 mg/kg) used as a positive control. We are currently studying the mechanism underlying the therapeutic role for EMR in CIA mice.

Key words : rheumatoid arthritis, mori ramulus, collagen-induced arthritis, draining lymph node(DLN)

### 서 론

桑枝는 뽕나무과에 속한 다년생 초본인 뽕나무 *Morus alba* Linne 또는 기타 동속 근연식물의 어린가지이다<sup>1)</sup>.

桑枝는 《本草圖經》<sup>2)</sup>에 기재된 이래, 淸熱祛風除濕, 通經血絡, 壯肺氣, 通利關節, 滋陰涼血, 利水退腫의 효능이 있어, 風濕痺痛, 中風半身不隨, 水腫脚氣, 肌體風痺, 水腫, 水氣, 白癜風, 風疹

\* 교신저자 : 서영배, 대전시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학 519호

· E-mail : genin@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2640

· 접수 : 2009/09/25 · 수정 : 2009/10/05 · 채택 : 2009/10/12

痠痒, 損傷性關節僵硬, 關節酸痛麻木, 四肢拘攣, 風濕性關節痛, 臂痛, 高血壓, 紫癩風 등의 치료에 사용된다<sup>3-7</sup>.

桑枝에는 tannin, stachyose, raffinose, arabinose, xylose, mulberrin, mulberrochromene, cyclomulberrin, betulinic acid, moracin A~H, morin, dihydromorin, maclurin, dihydrokaempferol, oxyresveratrol, dihydrooxyresveratrol, α-amyrin, 단당류 등이 함유되어 있는데, 이 중 morin은 항산화, 항염증 작용이 뛰어나 대식 세포로 유발된 염증을 억제시키는 효과가 있다고 보고되어 있다<sup>8-14</sup>.

桑枝의 약리작용에는 면역 조절 작용, 혈압 강하작용, 항균 작용, 養毛작용, 진통작용, 항염증작용 등이 있어, 고혈압, 류마티스 신경통, 당뇨병에 사용되며, 면역 체계적으로 저하된 림프구의 轉換率을 提高할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>15,16</sup>.

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis : RA)은 윤활 관절강 내의 염증성 싸이토키인, 단백질분해효소, pannus, 염증유발 면역 세포들에 의해 조직파괴가 수반되는 대표적인 자가면역질환의 하나로, 한의학에서는 風寒濕熱의 邪氣가 주원인이며, 祛風散寒, 溫通經脈, 清熱除濕 등의 治法이 사용된다<sup>17-19</sup>.

祛風濕藥에 속하는 桑枝가 祛風除濕, 通經血絡, 通利關節 등의 효능으로 風濕痺痛, 中風半身不隨, 拘攣疼痛, 屈伸不利, 肢體麻木 등의 증상치료에 사용되며, morin을 비롯한 약리작용으로 볼 때 桑枝가 RA 치료에 유효할 것으로 생각되었다.

이에 저자는 桑枝가 RA에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, in vivo 실험을 통하여 桑枝의 항류마티스 관절염 효과를 분석하고자, DBA/10IaHsd 생쥐에 type II collagen (CII)으로 RA를 유발시킨 후, 桑枝 추출물을 투여한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험 동물은 FOLAS INTERNATIONAL (서울, Korea)에서 분양받은 6주령의 DBA/10IaHsd 생쥐를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 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) 시료

본 실험에 사용한 桑枝 (Morus alba Linne; Mori Ramulus; MR)는 충남 공주 잠사시험장에서 2007년 4월 14일, 채취한 것을 대전대학교 한의과대학 본초학교실에서 陰乾시키고, 약전에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

Bovine type II collagen (Chondrex, USA), acetic acid, complete freund's adjuvant (Chondrex, USA), anti-collagen II

IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Chondrex, USA), methotrexate (MTX), 생리식염수, heparin, RNase inhibitor, random sequence hexanucleotide, dNTPs mix, RT buffer, RNazolB, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), DNase I, Taqman probe PCR Master mix (ABI), NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, demineralized water, trypan blue, ethyl ether, collagenase, Trimethylbenzene (TMB), antibody biotin-conjugated, formaldehyde, diethyl pyrocarbonate (DEPC), trypsin-0.2% EDTA, 3-4, 5-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2-H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichloro-dihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), lipopolysaccharide (LPS) 등은 Sigma사 (USA) 제품을, anti-CD3e-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr-1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD25-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD49b-PE, anti-IgE-FITC, anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, PE-conjugated goat anti-mouse IgG는 PharMingen사 제품, CD11b mAb는 Becton Dickinson사 (USA) 제품, anti-CD3 항체 (serotec, USA), anti-CD28 항체 (serotec, USA), IL-4, TNF-α, IL-6, IFN-γ는 ELISA kit (Biosource., USA), antibody Avidin-HRP conjugated (R&D system, USA), IgG RA factor, IgM RA factor ELISA kit (Shibatagi, Japan), anti-mouse Ig (Polysciences, Inc., Germany), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (USA) 제품을, DMED은 Gibco사 (USA), thioglycolate broth (Sigma, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), microwave oven (LG, Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), micro-pipet (Gilson, France), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), deep-freezer (Sanyo, Japan), centrifuge (Centrikon, Sigma), bio-freezer (Sanyo, Japan), primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), turbo thermal-cycler TM (Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), vacuum pump, rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), freeze dryer (Eyela, Japan), autoclave (Hirayama, Japan), imager system (Kodak, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), ELISA reader (Molecular devices, USA), cell strainer (Falcon, USA), 생화학기기 (Olympus, USA), 96-well Costar 접시 (Corning Inc, USA) 및 homogenizer (Omni, USA), BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), automatic ELISA washer (Bio-Tek, USA) 제품을, bright microscope (Nikon, Japan), Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

1) 시료 추출

桑枝 (Mori Ramulus; MR) 100 g에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였다. 위 과정을 3회 반복하였고, 3회 농축한 것을 모아서 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 桑枝 추출물 (15.7 g, extract of Mori Ramulus; EMR; DLH-07003)을 제조하였다. 이를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 증류수에 희석하여 실험시에 사용하였다.

2) 류마티스 관절염 생쥐 모델

CIA 생쥐 모델은 bovine type II collagen에 0.01 mol/L의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg을 DBA/10IaHsd 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/10IaHsd 생쥐 6마리를 한 군으로 CIA를 유발시키지 않은 정상군과 CIA 생쥐 대조군, CIA 생쥐에 methotrexate (0.3 mg/kg) 처리한 양성대조군과 CIA 생쥐에 EMR 100 mg/kg, EMR 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군으로 나누었다.

3) 시료 투여

DBA/10IaHsd 생쥐 6 마리씩을 한 군으로 하여 정상군 (normal:NR), 치료제를 처리하지 않은 대조군 (Control:CT), methotrexate (MTX:0.3 mg/kg) 처리군, EMR 처리군 (200 mg/kg, 100 mg/kg)으로 나누어 booster한 후 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 양성대조군은 MTX (0.3 mg/kg)를 1주일에 3회 각각 0.1 ml 씩 복강에 주사하였으며, EMR (200, 100 mg/kg) 처리군은 4주 동안 매일 오전 11시에 경구투여 하였다.

4) 관절염 지수 분석

CII로 boosting 후 DBA/10IaHsd 생쥐의 각 4개의 발에서 관절염 지수 (arthritis index:AI)를 측정하였는데, DBA/10IaHsd 생쥐의 각 4개의 발 (paw joints)에서 관절염 징후를 0 = no arthritis, 1 = small degree of arthritis, 2 = light swelling, 3 = medium swelling, 4 = severe swelling, 5 = severe swelling and non-weight-bearing 등으로 구분한 뒤, 각 4개의 발에 각 등급에 따라 0~5점까지 점수를 부여하고, CIA 유발 정도를 1주일 간격으로 기록하였다.

5) 채혈 및 혈청 분리

EMR의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12 ml이상의 혈액을 취하여 5 ml를 15 ml conical tube에 넣어 6,500 rpm에서 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다.

6) 혈청 및 혈장 성분 측정

분리된 혈청은 생화학기기를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartic acid transaminase (AST)를 측정하였다.

7) 배액 림프절의 총세포수 측정

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 생쥐에서 배액 림프절 (draining lymph node:DLN), paw joint (PJ)를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700

rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이것을 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

8) 형광 유세포 분석

CIA 생쥐에서 DLN을 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-Gr-1 FITC-anti-CD11b, FITC-anti-CD49b, FITC-anti-B220, PE-anti-CD45를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 DLN의 절대 세포수 (absolute number)를 산출한다. 측정된 DLN 세포를  $5 \times 10^5 / ml$  세포수로 조정 후 4℃에서 면역 형광염색 (immuno fluorescence staining)을 실시하여 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 백분율 (%)로 분석하였다.

9) Quantitative real-time PCR

(1) 관절조직에서 RNA 분리

CIA 생쥐에 4주간 약물을 처리하여 실험을 종료하고, 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 관절조직에 후 RNazolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였고 이를 얼음에 15분간 방치하였다. 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하였고 2-propanol 200 µl와 동량 혼합하여 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하였고 3분간 vacuum pump에서 건조시켜 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹였으며 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 반응은 준비된 total RNA 2 µg을 DNase I (10 U/µl) 2U/tube를 37℃ heating block에서 30분간 반응한 후 75℃에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하였고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하였고 37℃ heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

사용된 Probe는 mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Probe sequence : 5' TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG 3' (VIC) mouse. IL-17a 는, Probe sequence : 5' CTCTCCACC GCAATGAAGACCCTGA 3' (FAM). mouse IL-22는, Probe sequence : 5' GCCAAGGAGGCCAGCCTTG CAGATA 3' (FAM).

Th17 세포관련 유전자 발현은 Taqman probe PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard는 GAPDH를 사용하였고, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 : pre-denaturation은 2 min at 50°C, 10 min 94°C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95°C, 1 min at 60°C에서 수행하였다. 대조군은 internal standard로 G3PDH 를 사용하여 target group의 Quantitative PCR

$$y = x(1+e)^n$$

x = starting quantity  
y = yield  
n = number of cycles  
e = efficiency

로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였고, 실험은 2 회 반복하였다.

10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 혈청 내 ALT, AST 생성량 분석

정상군의 ALT 생성량은 35.8±3.8 U/L이고, 대조군의 ALT 생성량은 31±0.5 U/L이며, MTX를 0.3 mg/kg로 주사한 실험군의 ALT 생성량은 30.9±0.7 U/L, EMR을 200 mg/kg 농도로 처리한 실험군의 ALT 생성량은 33.1±4.1 U/L, EMR을 100 mg/kg 농도로 처리한 실험군의 ALT 생성량은 31.4±5.6 U/L로 대조군에 비해 유의성은 없었다(Fig. 1). 정상군의 AST 생성량은 108.7±5.5 U/L 이고, 대조군의 AST 생성량은 119.3±16.7 U/L이며, MTX를 0.3 mg/kg로 주사한 실험군의 AST 생성량은 136.7±5.9 U/L, EMR을 200 mg/kg 농도로 처리한 실험군의 AST 생성량은 119.6±5.6 U/L, EMR을 100 mg/kg 농도로 처리한 실험군의 AST 생성량은 104.6±12.2 U/L로 대조군에 비해 유의성은 없었다(Fig. 1).

2. 관절염 유발에 미치는 영향

관절염 유발을 매 주 한번씩 4주 동안 검사한 결과, 1주 동안 약물을 처리한 MTX 투여군 (0.3 mg/kg)과 EMR 투여군 (200 mg/kg, 100 mg/kg)의 관절염 지수가 대조군과 다른 양상으로 감

소되었으나, 대조군의 관절염 지수는 실험 종료 시까지 계속 증가되었다. MTX 투여군 (0.3 mg/kg)과 EMR 투여군 (200 mg/kg, 100 mg/kg)의 관절염 지수는 투약 2주 이후에는 일정한 상태를 보여주었다. 투약 1주후부터 MTX 투여군과 EMR 투여군의 관절염 지수가 대조군에 비하여 유의성 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)있게 감소 되었다(Fig. 2).

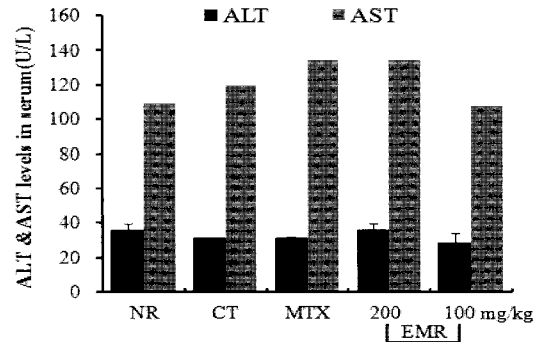


Fig. 1. Effects on alanine aminotransferase and aspartic acid transaminase levels in the DBA/10IaHsd mouse serum treated with extracts of Mori Ramulus. After second boosterization of collagen type II (C II), mice were divided into four groups and each group was treated with distilled water (DW, CT), extract of Mori Ramulus (EMR) or methotrexate (MTX). Normal mice without injection of collagen and Complete Freund's adjuvant were treated with H<sub>2</sub>O. We gathered blood from each group mice after 4-weeks administration of MTX and EMR. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. NR: Normal DBA/10IaHsd mouse group. CT: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml. MTX: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks. EMR 200: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks. EMR 100: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean±S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test.

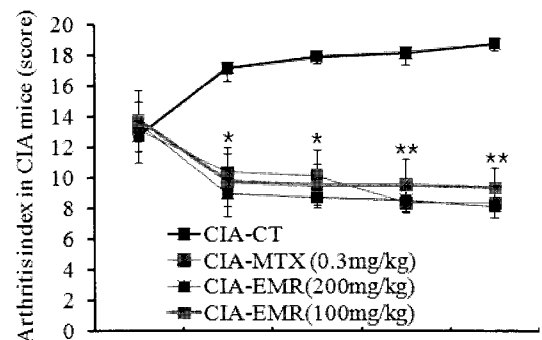
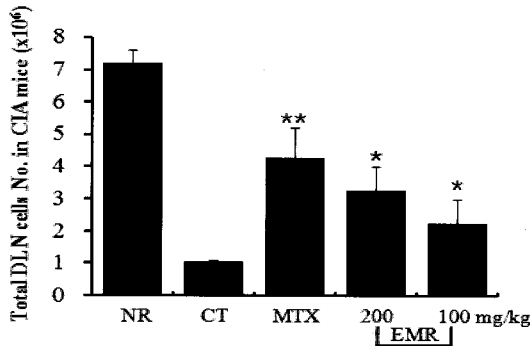


Fig. 2. Suppressive effects on arthritis index of paw joint in collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus. Arthritis index were scored according to Mann-Whitney U test at every seven days. After second boosterization of collagen type II (C II), mice were divided into four groups and each group was treated with DW (CT), extract of Mori Ramulus (EMR) or methotrexate (MTX). NR: Normal DBA/10IaHsd mouse group. CT: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml. MTX: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks. EMR 200: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks. EMR 100: DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1 µg/ml and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean±S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

3. 배액 림프절의 총 세포수에 미치는 영향

DLN 총 세포수에서 정상군은  $2.7 \pm 0.60 (\times 10^6)$ , 대조군은  $1.05 \pm 0.05 (\times 10^6)$ , MTX 투여군은  $4.30 \pm 0.9 (\times 10^6)$ , EMR 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $3.2 \pm 0.7 (\times 10^6)$ , EMR 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $2.3 \pm 0.7 (\times 10^6)$ 로 나타나 200 mg/kg, 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군에서 대조군에 비해 유의성 (\* $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다(Fig. 3).



**Fig. 3. Effects on total cells number of draining lymph nodes and paw joints in collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** DBA/10IaHsd mice were immunized with bovine type II collagen (C II). DBA/10IaHsd mice were boosted with C II after 3 weeks. After a second collagen immunization, mice were treated with methotrexate (MTX) three times a week and extract of Mori Ramulus (EMR) was treated once a day for 4 weeks. Oral administration of EMR (100 or 200 mg/kg) and injection of MTX significantly decreased the total cells number of draining lymph nodes and paw joints comparable to that of a control group. NR : Normal DBA/10IaHsd mouse group, CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1  $\mu$ g/ml, MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1  $\mu$ g/ml and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks, EMR 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1  $\mu$ g/ml and treated EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks, EMR 100 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with C II 1  $\mu$ g/ml and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

4. 배액 림프절 내 면역세포에 미치는 영향

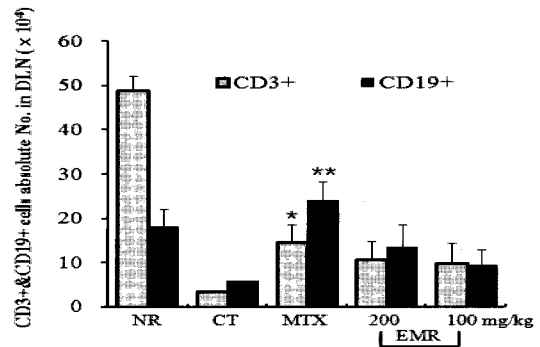
1) CD3+ 세포, CD19+ 세포 발현에 미치는 영향

정상군의 DLN 내 CD3+ 세포수는  $48.7 \pm 3.2 (\times 10^4)$ , 대조군의 CD3+ 세포수는  $3.3 \pm 0.3 (\times 10^4)$ , MTX 투여군의 CD3+ 세포수는  $14.6 \pm 3.9 (\times 10^4)$ , EMR 200 mg/kg 투여군의 CD3+ 세포수는  $10.6 \pm 4.2 (\times 10^4)$ , EMR 100 mg/kg 투여군의 CD3+ 세포수는  $9.8 \pm 4.7 (\times 10^4)$ 로 나타났다(Fig. 4). 정상군의 DLN 내 CD19+ 세포수는  $18.0 \pm 3.9 (\times 10^4)$ , 대조군의 CD19+ 세포수는  $5.7 \pm 0.1 (\times 10^4)$ , MTX 투여군의 CD19+ 세포수는  $23.9 \pm 4.4 (\times 10^4)$ , EMR 200 mg/kg 투여군의 CD19+ 세포수는  $13.3 \pm 5.1 (\times 10^4)$ , EMR 100 mg/kg 투여군의 CD19+ 세포수는  $9.3 \pm 3.5 (\times 10^4)$ 로 나타났다(Fig. 4).

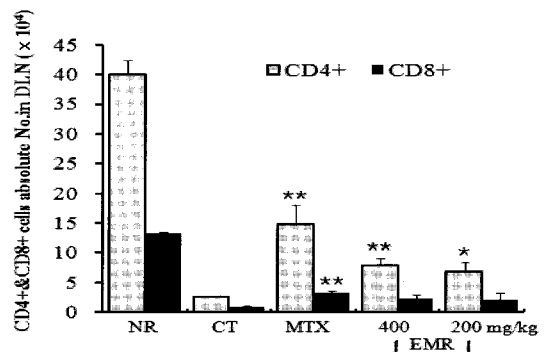
2) CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 발현에 미치는 영향

정상군의 DLN 내 CD4+ T 세포수는  $40.1 \pm 2.3 (\times 10^4)$ , 대조군은  $2.6 \pm 0.1 (\times 10^4)$ , MTX 투여군은  $14.8 \pm 3.4 (\times 10^4)$ , EMR 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $7.8 \pm 1.3 (\times 10^4)$ , EMR 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $6.9 \pm 1.5 (\times 10^4)$ 로 나타나, EMR 200 mg/kg, 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 CD4+ T 세포수가 대조군에 비해 유의성 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) 있게 증가되었다(Fig. 5). 정상군

의 DLN 내 CD8+ T 세포수는  $13.4 \pm 0.2 (\times 10^4)$ , 대조군은  $0.8 \pm 0.27 (\times 10^4)$ , MTX 투여군은  $3.3 \pm 0.42 (\times 10^4)$ , EMR 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $2.2 \pm 0.8 (\times 10^4)$ , EMR 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $2.0 \pm 1.3 (\times 10^4)$ 로 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 5).



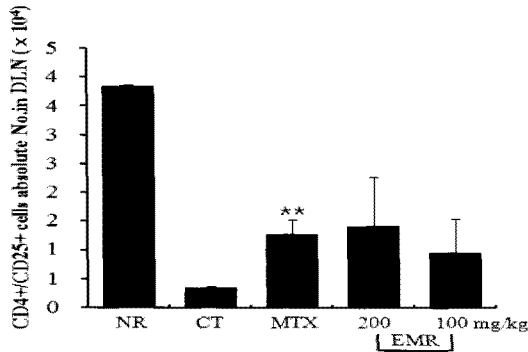
**Fig. 4. Effects on absolute number of CD3+ and CD19+ cells in draining lymph nodes of collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** Draining lymph node (DLN) cells ( $\times 10^4$  cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of methotrexate (MTX) and extract of Mori Ramulus (EMR). The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3 and anti-CD19 antibody and analyzed by flow cytometer. NR : Normal DBA/10IaHsd mouse group, CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml), MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks, EMR 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks, EMR 100 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 5. Effects on absolute number of CD4+ T cells and CD8+ T cells in draining lymph nodes of collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** Draining lymph node (DLN) cells ( $\times 10^4$  cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of methotrexate (MTX) and extract of Mori Ramulus (EMR). The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4 and anti-CD8 antibody and analyzed by flow cytometer. NR : Normal DBA/10IaHsd mouse group ; CT : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) ; MTX : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks ; EMR 200 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks ; EMR 100 : DBA/10IaHsd mouse group boosted with collagen type II (1  $\mu$ g/ml) and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

3) CD4+/CD25+ T 세포 발현에 미치는 영향

정상군의 DLN 내 CD4+/CD25+ T 세포수는  $3.8 \pm 0.1 (\times 10^4)$ , 대조군의 CD4+/CD25+ T 세포수는  $0.3 \pm 0.2 (\times 10^4)$ , MTX 투여군의 CD4+/CD25+ T 세포수는  $1.3 \pm 0.3 (\times 10^4)$ , EMR을 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 CD4+/CD25+ T 세포수는  $1.4 \pm 0.9 (\times 10^4)$ , EMR을 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 CD4+/CD25+ T 세포수는  $0.9 \pm 0.6 (\times 10^4)$ 로 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 6).



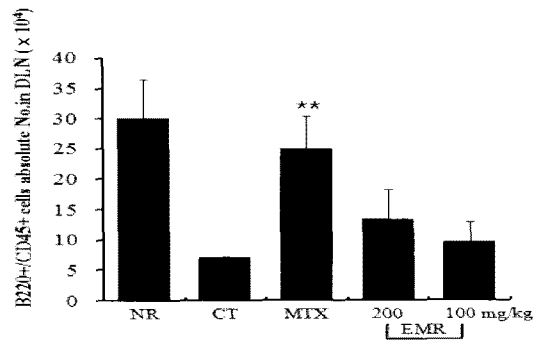
**Fig. 6. Effects on absolute number of CD4+/CD25+ T cells in draining lymph nodes of collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** Draining lymph nodes (DLN) cells ( $\times 10^4$  cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of methotrexate (MTX) and extract of Mori Ramulus (EMR). The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD4+/CD25+ antibodies and analyzed by flow cytometer. NR: Normal DBA/101aHsd mouse group. CT: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). MTX: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks. EMR 200: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks. EMR 100: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 99% or higher (\*\*p<0.01).

4) B220+/CD45+ B 세포 발현에 미치는 영향

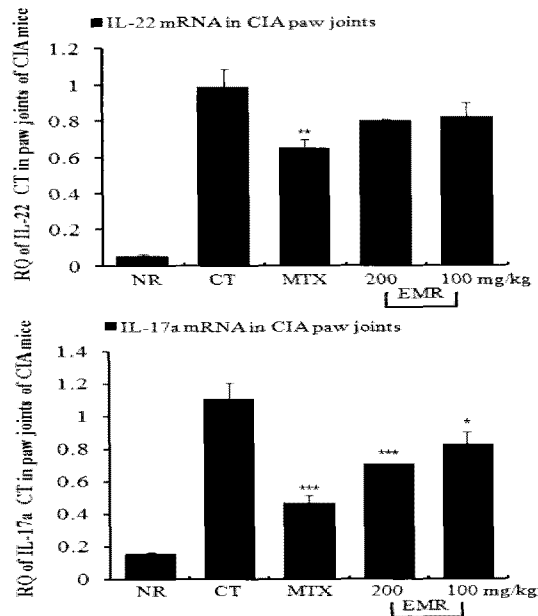
정상군의 DLN 내 B220+/CD45+ 세포수는  $29.9 \pm 6.5 (\times 10^4)$ , 대조군의 B220+/CD45+ 세포수는  $6.9 \pm 0.3 (\times 10^4)$ , MTX 투여군의 B220+/CD45+ 세포수는  $24.8 \pm 5.6 (\times 10^4)$ , EMR을 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 B220+/CD45+ 세포수는  $13.2 \pm 4.9 (\times 10^4)$ , EMR을 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군의 B220+/CD45+ 세포수는  $9.5 \pm 3.3 (\times 10^4)$ 로 대조군에 비해 증가되었으나, 유의성은 없었다(Fig. 7).

5. IL-17a, IL-22 mRNA 유전자 발현 분석

IL-17a mRNA 유전자 발현 분석에서, 정상군은  $0.153 \pm 0.012$ , 대조군은  $1.101 \pm 0.101$ , MTX 투여군은  $0.462 \pm 0.048$ , EMR을 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $0.701 \pm 0.005$ , EMR을 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $0.823 \pm 0.078$ 로 나타나 대조군에 비해 감소되었다. IL-22 mRNA 유전자 발현 분석에서, 정상군은  $0.055 \pm 0.025$ , 대조군은  $0.989 \pm 0.011$ , MTX 투여군은  $0.650 \pm 0.179$ , EMR을 200 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $0.802 \pm 0.009$ , EMR을 100 mg/kg 농도로 투여한 실험군은  $0.822 \pm 0.177$ 로 나타나 대조군에 비해 유의성 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 있게 감소되었다(Fig. 8).



**Fig. 7. Effects on the absolute number of B220+/CD45+ B cells in draining lymph nodes of collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** Draining lymph nodes (DLN) cells ( $\times 10^4$  cells/ml) were isolated following 4 weeks administration of methotrexate (MTX) and extract of Mori Ramulus (EMR). The cells were incubated with FITC-conjugated anti-B220+/CD45+ antibodies and analyzed by flow cytometer. NR: Normal DBA/101aHsd mouse group. CT: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). MTX: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks. EMR 200: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks. EMR 100: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 99% or higher (\*\*p<0.01).



**Fig. 8. Effects on expression of IL-17a, IL-22 mRNA in the paw joints of collagen-induced arthritis mice treated with extracts of Mori Ramulus.** Paw joints were collected from individual mouse after 4-weeks administration of methotrexate (MTX) and extract of Mori Ramulus (EMR). At the end of the experiment, the mice lung were removed and analyzed by real-time PCR. NR: Normal DBA/101aHsd mouse group; CT: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ); MTX: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with MTX 0.3 mg/kg three times a week for 4 weeks; EMR 200: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 200 mg/kg once a day for 4 weeks; EMR 100: DBA/101aHsd mouse group boosted with collagen type II ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated with EMR 100 mg/kg once a day for 4 weeks. The results are expressed mean $\pm$ S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's t-test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95%, 99% and 99.9% or higher (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

## 고찰

RA는 자가면역질환의 하나로 윤활 관절강 내에 각종 사이토카인과 단백분해효소, pannus에 의해 뼈가 파괴되고 연골이 소실되는 다발성 관절염을 일으키는 염증질환이며, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 통풍이 초래되나, 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발된다<sup>17,20)</sup>.

RA의 병리적 특징은 말단가동관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염으로, CD4+ T 세포, 대식세포, plasma 세포들이 synovial 관절에 침윤되어 유발되는 염증이다<sup>21,22)</sup>. RA는 대칭으로 분포하며, 활액막의 과증식, 혈관형성, 골의 침식으로 인해 관절의 변형을 가져온다.

RA의 활액막 세포들은 이상 증식되어 pannus를 형성함으로써 혈관 생성, 염증성 사이토카인의 분비, 고착분자와 단백질 분해효소 (matrix metalloproteinases : MMPs)의 유전자 발현 등을 증가시킨다. 더불어 각종 사이토카인이 病巢에 더욱 집중되어 NF-κB 활성을 유도하고 활액막 세포증식과 세포사멸간의 불균형을 촉진시킨다. 이러한 과정에는 ICAM-1, VCAM, IFN-γ, fibroblast growth factor (FGF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), transforming growth factor-β (TGF-β) 등이 개입되는 것으로 알려져 있다<sup>23-25)</sup>.

면역적으로 APC (antigen presenting cells)와 CD4+ T 세포들을 통한 세포외, 세포내 자가항체들이 RA의 면역 반응을 유발시키며, 단핵구와 대식세포가 계속적으로 보충이 되어 활성화가 되고, TNF-α와 IL-1이 관절강으로 분비된다. 이러한 사이토카인의 분비는 collagenase, metalloproteinase를 분비하는 세포들을 활성화시켜 조직파괴를 매개하며 연골의 소실과 뼈의 부식이 일어난다<sup>25)</sup>.

RA는 한의학에서 痺證의 범주에 속하는데, 《內經·素問》<sup>26)</sup>에 '風寒濕三氣雜至 合而爲痺也. 其風氣勝者爲行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲著痺也.' 라 하여 痺證의 원인을 風寒濕에 의한 邪氣로 보았으며, 후세에 痺證 중에 통증이 극심한 증상을 白虎病, 歷節風, 白虎歷節風, 痛風, 類風濕關節炎 등으로命名하였다.

痺證은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 腠理空疎 혹은 精氣虛弱한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 관절에 凝滯됨으로써 血氣運行을 저해하여 발병되며, 肌肉, 筋骨, 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利, 심하면 관절의 강직성 변형 등의 증상을 초래하게 된다<sup>27)</sup>.

痺證의 치료는 風寒濕의 각 邪氣와 병리변화로 인한 熱邪, 痰濁, 瘀血과 精氣虛實의 상태등의 辨證에 따라 祛風散寒, 溫通經脈, 清熱除濕, 活血和瘀, 祛痰, 補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝 등의 治法이 併用된다<sup>28,29)</sup>.

桑枝에 대한 기존의 연구에 아직 桑枝가 RA에 유효하다는 연구보고는 없는 실정이다. 이에 저자는 祛風濕藥에 속하는 桑枝가 祛風濕, 通利關節, 通經絡, 清熱除濕 등의 효능으로, 四肢經絡을 善達시켜 關節濕痺諸痛을 치료하고, 약리적으로 대식세포로

유발시킨 염증에 효과가 뛰어나므로 RA에 유효할 것으로 사료되었다.

CIA 생쥐 모델은 1977년 Trentham 등<sup>30)</sup>에 의해 처음 시작된 이래, 연구 소견에서 활액막 세포의 증식, pannus 형성, 연골과 뼈의 부식, 섬유화와 관절 기능의 상실 등의 증상면에서 인체의 RA와 매우 유사한 병리양상을 보인다고 하였으며, CIA는 전형적인 RA 동물 모델로 널리 이용되고 있다. 따라서 CIA 생쥐 모델을 이용하여 EMR의 치료 효과를 알아보기 위해 in vivo 실험을 수행하였다.

RA는 특히 Th1과 Th2 사이토카인의 균형이 깨지면서 Th1 우위의 사이토카인이 만들어져 나타나는 질환으로 보고되고 있으며<sup>31)</sup>, CD4+ T 세포는 RA의 면역 염증 질환 유발과 관절의 파괴에 있어 주요한 역할을 담당하는데, 그 중 IFN-γ 생산이 우세한 Th1 세포들이 주요인이며, IL-12는 강력한 Th1 세포와 Th2 세포 비율의 균형을 깨뜨리는 자극제이다. Th 세포의 상호 전환에서, IFN-γ, IL-17의 생산은 Th2 세포로 shift 되는 조건을 악화시키며, 이들의 증가는 Th1 세포로 shift 되는 조건을 호전시킨다. 이러한 결과는 Th2 세포 클론들은 항상 전이될 준비가 되어 있고, Th0과 Th1 세포 클론들은 Th2 세포에 비해 안정적이기 때문이다. 또한 기억 CD8+ T 세포의 증가되면 Th2 세포로 shift되고, 기억 CD4+ T 세포의 감소는 Th1 세포로 shift되게 한다<sup>32)</sup>.

In vivo 실험으로, 생체 내 간독성 여부를 알아보기 위해 혈청 내의 ALT, AST 검사를 시행하였으며, 검사 결과 桑枝에 대한 약물 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

AI를 분석한 결과, 대조군의 AI는 실험종료까지 증가되었으나, MTX 투여군과 EMR (200 mg/kg, 100 mg/kg) 투여군은 약물 투여 1주째부터 AI가 감소되었으며, 2주부터는 AI의 감소가 보이지 않고 일정한 관절염 지수를 보였다(Fig. 2). 이는 약물 처리로 인해 관절염의 악화가 진행되지 않았음을 시사한다.

DLN 내의 총세포수를 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군의 세포수가 현저하게 감소되어 있었고, MTX 투여군과 EMR (200 mg/kg, 100 mg/kg) 투여군의 총세포수는 대조군보다 유의성 있게 증가되었다(Fig. 3). 이는 대조군의 RA 조직 염증 병리상황에서, 여러 APC들이 림프절에 존재하는 염증성 면역세포를 자극시켜 病巢로 이주시키기 때문이며, 반대로 EMR을 투여한 실험군의 경우 염증이 완화되어 병소로 이주되는 경향이 감소되기 때문이다(Fig. 3).

B 세포는 RA에서 arthritogenic anti-CII 항체들을 생산하며, 이 항체들은 연골과 결합되어 관절염을 유발시킨다<sup>33,34)</sup>. 자가항체들은 모든 자가 면역 질환에서 기본적인 것이며, auto-reactive B 세포와 Th1 세포 발현으로 유도되는 형질세포에 의한 생산물이다<sup>35)</sup>. 따라서 RF와 다른 항체를 생산하는 B 세포의 조절곤란, 면역 복합체의 형성, 파괴매개물의 분비로 인해 관절 조직이 파괴되며 연골, 뼈의 부식이 일어난다.

CD4+/CD25+ regulatory T 세포는 in vitro와 in vivo에서 T 세포 반응을 억제시키는 역할을 수행하며, RA 환자의 CD4+/CD25+ T 세포는 TNF-α와 IFN-γ를 생성하는 활성화 Th1 세포를 효과적으로 억제시키고, 직접적으로 CII-specific T 세포

와 B 세포의 면역 반응을 억제시키지 않아도 관절염의 병세를 경감시킨다<sup>36,37</sup>. 따라서 대조군의 CD4+/CD25+ T 세포는 감소된 반면, EMR (200 mg/kg, 100 mg/kg) 투여군의 세포수는 유의성 있게 증가된 것으로 보아(Fig. 6) EMR이 CD4+/CD25+ T 세포를 활성화시켜 RA를 호전시킬 수 있다고 생각된다.

DLN의 세포수를 분석한 결과, CII 주사후 10주 이상된 CIA 생쥐는 대체적으로 DLN이 정상군에 비해 현저하게 작아져 있다. 이는 관절염 염증조직으로 염증 T 세포를 DLN으로부터 계속 공급받아야 되는 염증질환 메카니즘의 일환으로, DLN의 naive T 세포 등이 염증조직에서의 수지상세포 (dendritic cell : DC)나 APC에 의한 cross-presentation에 의하여 활성화된다<sup>38</sup>. 그리고 DC나 APC 세포가 DLN로 homing하여 활성화시킨 염증면역 mature T 세포를 계속적으로 관절염 염증조직으로 이동시키기 때문에 DLN의 총세포수와 면역세포수는 만성일수록, 염증이 심화될수록 현저하게 감소를 하게 된다.

실험 결과, 정상군에 비해 대조군의 DLN의 총세포수가 현저히 감소하였고, EMR의 투여로 대조군에 비하여 DLN의 총세포수가 유의성 있게 증가되었다. 또한 DLN의 대조군에서 CD3+ T세포와 관련된 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4+/CD25+ T 세포와 CD19+ 세포가 정상군에 비하여 현저하게 감소되어 있었고, EMR의 투여로 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4+/CD25+ T 세포와 CD19+ 세포가 세포 등이 모두 유의성 있게 증가를 나타내었다. 이는 病巢의 염증성 싸이토카인 분비 감소와 DC나 APC에 의한 cross-presentation에 의하여 활성화가 억제되어 병소로의 이주가 감소되었음을 의미한다. 그런데 CD4+/CD25+ T 세포가 증가하였다고 하여 반드시 regulatory T 세포가 증가하였다고는 볼 수 없는데. 이는 regulatory T 세포가 되기 위한 CD62L이나, CD152, 그리고 Foxp3 유전자가 증가하였는지를 관찰해야한다<sup>39</sup>. 즉, EMR이 regulatory T 세포를 up-regulation하여 관절염이 치료된다고 한다면 위와 같이 좀 더 추가적인 연구가 진행되어야 될 것으로 보인다.

CD4+/CD45+ T 세포들이 20~30% 비율로 활액 조직 내에 존재하며, 표면 phenotype 50% 이상이 DR, VLA-1, VLA-4, VLA-7을 가지고 있으며<sup>21</sup>, 이들이 proinflammatory 싸이토카인인 IL-17을 분비하는데, 골관절염을 가진 환자들에 비해 RA 환자의 윤활관절강에서 과대생산되는 것을 관찰할 수 있다. IL-17을 생산하는 별개의 세포모집단을 Th17 T 세포라 하며, naive CD4+ 세포로부터 Th17 T 세포로 분화되는 것은 STAT1, T-bet, STAT4, STAT6 들과는 별개의 방법으로 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6에 의해 유도된다. Th17 T 세포는 IL-1, IL-17a, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF- $\alpha$ , IL-8, GM-CSF 등을 생산하며 조직의 염증과 세포의 박테리아와 투쟁하는 중성구의 활성화 모두에서 필수적인 역할을 수행한다고 밝혀졌다<sup>40,41</sup>.

IL-17과 IL-23p19는 혈청, 활액, 활액막 생검에서 대부분의 RA환자에서 존재하나, 퇴행성 관절염 환자에게는 존재하지 않는다<sup>42</sup>. IL-17은 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , G-CSF, NF- $\kappa$ B 등을 포함하여 세포의 활성화와 성장, 분화에서 유전자 생산을 up-regulate 하며<sup>43,44</sup>, 싸이토카인 분비를 부가적인 증가를 이끌

면서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 영향력을 더욱 강하게 하므로, IL-17 생성 억제를 통한 RA 염증 치료 연구가 진행되고 있다. 또한 IL-17은 RA 활액막 fibroblast 세포들이 IL-6, IL-8, VEGF (vascular endothelial growth factor)를 합성하도록 활성화시키며, IL-6와 IL-8은 NF- $\kappa$ B와 PI3-K/Akt에 의한 경로를 통해 합성된다<sup>45,46</sup>.

IL-17은 IL-6의 생산과 콜라겐 파괴와 RA 활액막 팽창을 통한 콜라겐 합성을 증가시켜, RA의 뼈 팽창에 의한 뼈의 흡수를 촉진시키고, osteoclastogenesis와 연골 파괴를 증가시킨다. IL-17로 자극된 RA 활액막 fibroblast 세포에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10 등의 활액막 mRNA 발현 정도는 손상과정의 전조가 되며, IL-23p19 mRNA 유전자 발현과 IL-23과 서로 잘 연관되어 있다. IL-23은 심층 표피 조직의 과형성을 유발시키고 IL-22로 매개되어 영향이 나타나는데, IL-22는 활성화된 Th17 T 세포의 생산물이다. IL-22는 활액막 섬유아세포와 대식세포에 의해 생산되며 RA 활액 조직에서 활액막 섬유아세포가 생산하는 케모카인과 침윤을 통해 염증반응을 진행시킨다.

EMR이 CIA 생쥐 모델에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험 결과, EMR은 Th17 T 세포의 억제를 통해 관절염의 증상이 완화되었다고 볼 수 있는데, 최근에 anti-IL-17 항체를 통한 치료가 CIA의 중증도를 현저하게 감소시킬 수 있다는 연구 보고로 볼 때, EMR이 anti-IL-17 항체와 같은 역할을 수행할 수 있다고 사료된다. 또한 IL-17은 활액막 fibroblast 세포들이 IL-6, IL-8, VEGF (vascular endothelial growth factor)를 합성하도록 활성화시켜 싸이토카인을 분비시킨다. 따라서 EMR이 IL-17의 생성에 영향을 미쳐 활액막 fibroblast 세포들이 NF- $\kappa$ B와 PI3-K/Akt에 의한 경로를 통해 IL-6를 합성하는 것을 강력하게 억제시켰으며, IL-6 합성이 감소됨으로서 B 세포에 대한 자극이 감소되어 자가항체의 생성량을 유의성 있게 감소시켰으며, 관절 조직의 뼈와 연골의 파괴를 감소시켰고 feedback 작용을 통해 Th 17 T 세포로 분화되는 것을 억제시켰다고 사료된다. 다만 추가적으로 TGF- $\beta$ , IL-23p19에 대한 mRNA 유전자 발현 분석 및 혈청 내 생성량 분석과 Foxp3 유전자 분석을 통한 CD4+/CD25+ T 세포에 대해 향후에 연구함으로써 좀 더 정확한 기전 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결론

류마티스 관절염 동물 모델을 이용하여 桑枝의 효능을 실험적으로 검색하고자, DBA/10LaHsd 생쥐에서의 콜라겐으로 관절염을 유발하여 간독성 검사, 관절염 지수, 관절 조직 변화, PBMC, DLN, Pj의 면역 세포 변화, 혈청 내 싸이토카인 생성량, 혈청 내 rheumatoid factor 농도 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

EMR이 생체 독성을 가지고 있는지 알아보기 위해, 혈청 내 AST, ALT 검사를 분석한 결과, EMR은 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량에서 간독성을 보이지 않았다. EMR의 관절염 유발 정도를 분석한 결과, EMR을 투여한 실험군은 관절염 유발을 유의성 있게 감소시켰다. EMR이 총 면역 세포에 미치는 영향을 분석



한 결과, EMR은 DLN의 총 세포수는 증가시켰다. EMR을 투여한 실험군의 DLN 세포수를 분석한 결과, CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/CD25+, B220+/CD45+ 세포수는 유의성 있게 증가시켰다. EMR을 투여한 실험군의 관절 조직 IL-17a, IL-22 mRNA 유전자 분석 결과, 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

결론적으로 본 연구를 통해서 RA에 유용할 수 있는桑枝의 새로운 효능을 확인하였다. CIA 모델 생쥐에서 EMR 효능은 Th17 세포를 강력하게 억제하여, IL-6의 생성량을 감소시키고, 추가적으로 B세포의 증식을 억제한다. 또한 억제 T세포의 발현을 촉진시킴으로서 관절염지수 감소 및 조직병변이 감소되었다고 생각된다. 다만 CD4+/CD25+ T 세포의 증가로 인해 Th17 세포와 염증성 면역세포가 억제된 것인지는 추후 정확한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전의생약규격집. 서울, 식품의약품안전청, p 209, 2006.
2. 蘇頌編選, 尙志鈞輯校. 本草圖經. 合肥, 安徽科學技術出版社, p 380, 1986.
3. <中華本草> 編委會. 中華本草. 上海, 上海科學技術出版社, pp 530-531, 1999.
4. 顏正華. 中藥學. 北京, 人民衛生出版社, pp 694-695, 1991.
5. 肖培根主著. 新編中藥志. 北京, 化學工業出版社, pp 661-663, 2002.
6. 雷載權, 張廷模主編. 中華臨床中藥學. 北京, 人民衛生出版社, pp 762-764, 1999.
7. 辛民教. 臨床本草學. 서울, 永林社, pp 246-247, 2000.
8. 冉先德主編. 中華藥海. 北京, 哈爾濱出版社, pp 689-691, 1996.
9. 徐國均. 何宏賢主, 徐珞珊, 金蓉鸞編. 中國藥材學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 707-709, 1996.
10. 徐國均. 藥材學. 北京, 人民衛生出版社, p 215, 1963.
11. 王浴生主編. 中藥藥理及應用. 北京, 人民衛生出版社, p 925, 1983.
12. J. Gálvez, G. Coelho, M.E. Crespo, T. Cruz, M.E. Rodríguez, A. Concha, M. Gonzalez. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 15(12):2027-2039, 2001.
13. Lisu Wang, Yi-Chen Tu, Tzi-Wei Lian, Jing-Ting Hung, Jui-Hung Yen, and Ming-Jiuan Wu. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54(26):9798-9804, 2006.
14. Fang, S.H., Hou, Y.C., Chang, W.C., Hsiu, S.L., Lee Chao, P.D., Chiang, B.L. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. *Life sciences*. 74(6):743-756, 2003.
15. Vaghasiya, R.G., Banerjee, A., Shrivastava, N., Nivsarkar, M. Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Hydroalcoholic Extract of Morus Alba Linne. *Indian drugs*. 44(5):364-367, 2007.
16. Ye, F., Shen, Z.F., Qiao, F.X., Zhao, D.Y., Xie, M.Z. Experimental Treatment of Complications in Alloxan Diabetic Rats with  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from the Chinese Medicinal Herb Ramulus mori. *Acta pharmaceutica sinica*. 37(2):108-112, 2002.
17. Peter Schenck, Stefan Schneider, Rolf Miehlike and Peter Prehm. Synthesis and degradation of hyaluronate by synovia from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol*. 22: 400-405, 1995.
18. 제정진. 血府逐瘀湯이 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 경희대학교 대학원, 1993.
19. 方藥中, 李克光, 鄧鐵濤, 金壽山, 黃星垣, 董建華 等編. 實用中醫內科學. 서울, 醫聖堂, pp 558-559, 1993.
20. 金穆鉉. 류머티양 관절염의 역학. 대한의학협회지, 29(1):7-10, 1986.
21. M. Feldmann, F.M. Brennan and R.N. Maini. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 85: 307-310, 1996.
22. F. Wolfe and D.J. Hawley. The longterm outcomes of rheumatoid arthritis : work disability : a prospective 18 year study of 823 patients. *Journal of Rheumatology*. 25: 2108-2117, 1998.
23. Breedveld, F.C. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl*. 53: 3-7, 1998.
24. Koch, A.E., Kunkel, S.L., Strieter, R.M. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Invest Med*. 43: 28-38, 1995.
25. F. Goldblatt and D.A. Isenberg. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 140: 195-204, 2005.
26. 痺論. 黃帝內經 素問釋解. 서울, 一中社, p 328, 1998.
27. 한방재활의과학회. 한방재활의과학. 서울, 군자출판사, p 78, 2003.
28. 강인수. 비증치료의 용약에 대한 소고. 대한한의학회지 11(1):245-252, 1990.
29. 제정진. 血府逐瘀湯이 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 경희대학교 대학원, 석사, 1993.
30. Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H. Autoimmunity to type II collagen ; An experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 145: 857-868, 1977.
31. A.J. QUAYLE, P. CHOMARAT, P. MIOSSEC, J. KJELDEN-KRAGH and Oslash, F. and Oslash RRE, J.B. NATVIG. Rheumatoid Inflammatory T-Cell Clones express mostly Th1 but also Th2 and Mixed (Th0-Like) Cytokine Patterns. *Scandinavian Journal of Immunology*. 38(1):75-82, 1993.

32. Adorini, I., Guery, J.C., Trembleau, S. Manipulation of the Th1/Th2 cell balance an approach to treat human autoimmune diseases? *Autoimmunity*. 23: 53-68, 1996.
33. K.S. Nandakumar, J. Backlund, M. Vestberg, R. Holmdahl. Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of Tor B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells, *Arthritis Res. Ther.* 6: 544-550, 2004.
34. K.S. Nandakumar, R. Holmdahl, Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis, *J. Immunol. Methods*. 304: 126-136, 2005.
35. Smiley, J.D., Moore, S.E.J. Molecular mechanisms of autoimmunity. *American journal of Medical Science*. 295: 478-496, 1988.
36. Morgan Flierman, R., van Duivenvoorde, L.M., Witteveen, H.J., van Ewijk, W., van Laar, J.M., de Vries, R.R., Toes, R.E. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 regulatory T cells. *Arthritis and Rheumatism*. 52: 2212-2221, 2005.
37. Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Advances in Immunology*. 81: 331, 2003.
38. Kai, H., Shibuya, K., Wang, Y., Kameta, H., Kameyama, T., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Honda, S., Matsumoto, I., Koyama, A., Sumida, T., Shibuya, A. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology*. 118(2):233-239, 2006.
39. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., O'Valle, F., Delgado, M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 56(2):531-543, 2007.
40. Gerard, E., Kaiko Jay, C. Horvat, Kenneth, W. Beagley and Philip M. Hansbro. Immunological decision-making how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 123(3):326-338, 2007.
41. Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203: 2271-2279, 2006.
42. Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103: 1345-1352, 1999.
43. Cai XY, Gommoll CP Jr, Justice L, Narula SK, Fine JS. Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett.* 62 : 51-58, 1998.
44. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier Jet al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 160 : 3513-3521, 1998.
45. Hwang, S.Y., Kim, J.Y., Park, M.K., Moon, Y., Kim, W.U., Kim, H.Y. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF- $\kappa$ B- and P13-kinase/AK1-dependent pathways. *Arthritis Res Ther.* 6: 120-128, 2004.
46. Ryu, S., Lee, J.H., Kim, S.I. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Rheumatol.* 25: 16-20, 2005.