

마우스에서 Collagen Induced Arthritis 발생에 미치는 Diterpenoid의 영양

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 내과학교실[†], 미생물학교실*, 중앙대학교 약학대학**

김동수 · 박용범[†] · 이봉기* · 한덕룡**

— Abstract —

The Effect of Diterpenoid Extracted from Acanthopanax Koreanum on the Collagen Induced Arthritis in DBA/1 Mice

Dong Soo Kim, Yong Beom Park[†], Bong Ki Lee*, Dug-Ryong Hahn**

Department of Pediatrics, Internal Medicine[†] and Microbiology*, Yonsei University
College of Medicine, and College of Pharmacy**, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Objective : No medication currently available for the treatment of rheumatoid arthritis is universally effective, and all can produce adverse effects. It is well known that the Acanthopanax koreanum extract has an anti-inflammatory action without any adverse effects reported. It is also reported that diterpenoid which is a partially purified product extracted from Acanthopanax koreanum has an anti-inflammatory effect. We conducted this study whether diterpenoid extracted from Acanthopanax koreanum has a regressive effect of collagen induced arthritis in DBA/1 mice.

Methods : Four groups of DBA/1 mice were immunized by intradermal injection of 1mg/kg chicken type II collagen with complete Freund's adjuvant. Group II received 5mg/kg of diterpenoid extracted from Acanthopanax koreanum orally daily and Group III receive 5mg/kg of phenylpropanoids extracted from Acan-

<접수일 : 1999년 7월 21일, 심사통과일 : 1999년 12월 15일>

*통신저자 : 김동수
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : (02) 361-5524, Fax : 393-9118

thopanax koreanum orally daily. Group IV received 1mg/kg dexamethasone intraperitoneally twice weekly. Group I received no treatment. The prevalence of arthritis were assessed twice weekly. Serum anti-collagen antibody was measured by ELISA. Stimulation index of cultured splenocytes was measured. Tumor necrosis factor- α and interleukin-10 levels in the supernatant of cultured splenocytes stimulated with Con. A were also measured by ELISA.

Result : Collagen induced arthritis(CIA) started to develop 5 weeks after collagen injections. In diterpenoid treated group, CIA seemed to be regressed, but in phenylpropranoid group, regressive effect of arthritis was not observed. In dexamethasone treated group, both of suppression of CIA could be observed. Levels of anti-collagen antibodies were reduced in dexamethasone treated group, but not in both diterpenoid and phenylpropranoid group. No significant differences of splenic mononuclear cell SI among the groups was observed. There was an increased secretion of interleukin-10 in the supernatant of cultured splenocytes stimulated by Con A of the diterpenoid treated group.

Conclusions : These findings showed that the diterpenoid extracted from Acanthopanax koreanum have an effect on suppression of CIA.

Key Words : Collagen induced arthritis, Interleukin-10, Acanthopanax koreanum extract, Diterpenoid

서 론

오가피에서 또는 오갈피라고 불리우는 식물은 오가피과에 속하는 낙엽활엽관목으로서 인삼 및 두릅과 같은 과에 속하고 잎이 인삼과 산삼의 잎과 구분이 잘 되지 않을 정도로 같은 모양이며, 우리나라 산야에서 자생되고 있는 오가피는 Acanthopanax koranum이라는 학명으로 불리우고, 이 Acanthopanax koreanum은 그 잎모양이나 가지 등의 모양에 따라 약 10여종으로 다시 나뉘어지고 있다¹⁾.

이러한 오가피 추출물의 효과는 여러 가지로 알려져 있지만 그 중에서 소염효과가 탁월하여 천식과 같은 만성질환이나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에 사용되어 왔다²⁾. 최근들어 Kim 등^{2,4)}에 의하면 오가피 추출물 중에서 특히 diterpenoid 류가 소염작용을 보이는 가장 중요한 성분이라고 보고하고 있다. 이들의 보고에 의하면 acanthopanax에서 추출된 diter-

penoid 류는 아스피린에 비하여 최소 5배 이상의 강력한 소염, 진통 작용이 있음을 보고하였으며, 이러한 작용의 기전은 염증성 물질의 매개체인 prostaglandin이나 leukotriene의 생성과정을 차단하는 것으로 생각된다고 하였다. 이러한 기전은 기존의 류마티스 관절염의 치료제로 사용되는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs) 계통의 약물과 유사한 것으로 생각되며, 실제적으로 류마티스 관절염에 사용될 수 있는 가능성을 생각할 수 있다.

류마티스 관절염은 아직까지도 그 원인이 불분명한 질환으로 전 세계적으로 뿐만 아니라 우리나라에서도 많은 환자들이 고통을 받고 있는 질환이다⁵⁾. 류마티스 관절염의 치료는 원인이 불분명하기 때문에 특별한 치료는 없고 다양한 항염제제들 소위 NSAIDs가 사용되고 있으며 일차적으로 이들 NSAID에 반응하지 않은 경우에는 2차적으로 disease modifying antirheumatic drugs(DMARDs)를 사용하고 그외 다양한 실험적인 약물들이 사용되고 있는 실정이다⁶⁾.

이러한 상황은 결국 어느 하나 좋은 치료약물이 없다는 것이다. 이들 약물들은 다양한 부작용을 보이고 있기 때문에 이러한 부작용을 적게하고 항염 작용은 극대화하려는 노력이 계속되고 있는 실정이다.

저자는 이미 *acanthopanax* 추출물이 류마티스 관절염 치료제로 사용될 수 있는지의 가능성을 조사하기 위하여 먼저 류마티스 관절염의 대표적인 동물 모델인 DBA/1 마우스를 이용한 collagen induced arthritis(CIA)를 유발하면서, *acanthopanax* 수용성 추출물을 투여한 결과 약물투여 10주후에 약간의 효과가 있는 것으로 보인 이외에는 특별한 효과가 없는 것을 보고하였다⁷⁾. 이와 같이 효과가 없는 이유는 첫째로 실제로 *acanthopanax* 추출물이 CIA의 유발 및 치료에 전혀 효과가 없는 것으로 생각할 수 있고, 둘째로는 실험 10주째에 효과가 약간 있는 것으로 보아 장기 투여에 의하여 효과를 기대 할 수 있던지 아니면 현재 사용한 양이 일반적으로 사람에서 추천되는 양을 체중으로 환산하여 마우스에게 투여한 것이므로 투여 양을 높이면 효과를 기대할 수 있으리라고 생각되었으며, 세 번째로는 *acanthopanax* 추출물이 항염, 소염작용을 가지는 것은 주로 이 추출물 속에 함유된 diterpenoid에 의 한 작용이므로 수용성 추출물에는 함유되어 있지 않아서 이러한 결과가 관찰된 것이라고 생각하였다. 그러므로 이번 연구에서는 앞서 기술한 대로 항염효과가 증명된 *acanthopanax* 추출물 중에서 diterpenoid를 투여하여 CIA의 치료 효과가 있는지를 알아보기 위하여 본 연구를 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

DBA/1 mouse는 5주령의 암컷을 일본 Charles Liver에서 수입하여 2주간 본교 실험동물 사육실에서 적응하도록 한 후 7주령(20-25g) 부터 실험에 사용하였다.

2. *Acanthopanax* 추출물

오가피 나무의 뿌리 및 줄기에서부터 piraman계 diterpenoic acid(ent-pirama-9(11)-15 dien-19-

oic acid)와 lignan계의 phenylpropanoids의 두 종류를 중앙대학교 약학대학에서 기증받아 실험에 사용하였다. 간단히 요약하면 오가피 뿌리와 줄기의 ether추출물을 silicagel chromatography에 의해 n-hexane:ethyl acetate(10:1 vol)으로 elution한 다음 다시 silicagel chromatography를 실시하여 얻은 결정을 n-hexane에서 재결정하여 ent-pirama-9(11), 15 dien-19-oic acid를 얻었다. Phenylpropanoids는 오가피 뿌리의 methyl alcohol추출물을 농축하여 Al₂O₃ column에 chloroform:methyl alcohol(2:1 vol)로 용축한 후 농축하여 진공건조하여 얻었다.

3. CIA의 유발

기존의 방법^{8,9)}에 따라 분리정량된 chicken type II collagen(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 0.01N 아세트산에 녹여 2mg/mL의 농도가 되도록 한 후 4°C에서 18시간 정도 저어준 다음 동량의 complete Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞어 emulsion으로 만들었다. 이를 100μL 씩 마우스 꼬리의 기시부근에 피내 주사하였고 처음 주사한지 3주 후 동일한 방법으로 추가접종하였다.

4. 실험군

실험동물은 4개군으로 나누었고 각 군은 10마리였다. 제 I 군은 collagen을 투여하여 관절염을 유발시키면서 아무런 처치를 하지 않았고, 제 II 군은 collagen을 접종하여 관절염을 유발시키면서 *acanthopanax* 추출물 중 diterpenoic acid를 매일 경구로 투여하였으며(오가피 I군), 제 III 군은 collagen을 투여하면서 동시에 *acanthopanax* 추출물 중 phenylpropanoids(5mg/kg)를 매일 경구 투여하였고(오가피 II군), 제 IV 군은 collagen을 투여하면서 동시에 dexamethasone(1mg/kg)을 복강 내로 주2회 투여하였다. 이들은 모두 실험 시작 후 3주째부터 시작하여 10주째까지 투여하였고 동시에 관절 염의 증증도를 10주까지 관찰하였다.

5. 관절염 증증도의 평가

주 2회 육안으로 발의 발적과 부종 및 기형의 발생

유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 중증도를 조사하였다. 관절염의 중증도는 일반적인 육안검사를 통하여 실시하였다¹⁰⁾. Score 0은 발에 아무런 질환이 발현되지 않은 정상적인 상태이며, score 1은 한두 개의 발가락에 종창을 동반한 홍조를 띠거나, 최소한의 종창이 유발된 상태, score 2는 확실한 홍조를 띠거나 국부적 상지 종창, 그리고 이러한 것이 여러 발가락에서 관찰되는 경우이며, score 3은 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되며 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 하였다. 각각의 발에서 나타나는 score는 모두 합산하여 마우스의 CIA score로 나타내어 최소 0부터 최대 12의 값을 갖게 된다.

6. 면역반응 평가

1) 항 collagen 항체치

실험 10주째에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 측정 시까지 검체는 영하 70°C에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 항collagen 항체를 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, 96 well polystyrene microplate(Nunc, Denmark)의 각 well에 0.1M PBS에 녹인 chicken type II collagen(10 μ g/ml)을 가하여 4°C에서 16시간 동안 방치한 후 PBS-0.05% Tween 20으로 well을 4회 세척하였다. 비특이적 결합의 방지를 위해 각 well에 PBS-0.5% bovine serum albumine을 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 마우스의 혈청은 1:10으로 희석하여 각 well에 넣고 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 그 후 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG, A, M을 1:5,000으로 희석한 것을 각 well에 넣어 1시간동안 반응 시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 substrate를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 검체의 항 collagen 항체치 측정은 2차례 시행하여 평균값을 얻었다. 예비실험에서 심한 CIA를 소견을 보인 DBA/1 마우스 마리의 혼주혈청의 값을 100 unit로 정하였고 흡광도와 unit 간에는 직선형의 상관관계를 확인하였으며, 이때 정상의 마우스에

서는 항 collagen 항체가 검출되지 않았다.

2) 비장 단핵세포 자극에 의한 cytokine 생성측정 세포 면역 반응의 평가를 위해 비장 단핵세포의 자극에 의한 cytokine 분비를 측정하였다. 방법을 요약하면, 실험 10주째 동물을 희생한 후 비장을 무균적으로 적출하여 주변의 조직을 제거한 후 PBS로 수차례 세척하였다. 비장 조직을 잘게 잘라 Hank's balanced salt solution(HBSS, containing 10nM HEPES, pH 7.4)에 넣어 세포를 부드럽게 분리시킨 후 무균 거즈에 걸러 응괴를 제거하였다. 걸려진 세포부유액은 원심분리하여 상층액을 제거한 후 0.015M Tris/0.14M NH₄Cl(pH 7.4)으로 처리하여 적혈구를 제거하였고 다시 HBSS로 3회 세척하였다. 처리된 세포는 RPMI 1640-10% fetal calf serum media에 부유시켜 1 x 10⁶ cell/ml 농도로 만든 후 멸균된 well plate에 각 well당 100 μ L씩 넣었다. 각 well에 Con A 1mg/mL을 10 μ L씩 넣은 후 5% CO₂ 배양기에서 37°C를 유지하며 72시간 동안 배양 하면서 상청액을 취하여 영하 70°C에 보관하였다.

3) 배양된 비장세포의 상층액내 TNF- α 치의 측정

측정시까지 검체는 영하 70°C에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 혈청 TNF- α 를 R&D사(Minneapolis, MN, USA)의 mouse TNF- α ELISA kit로 manual의 방법에 따라 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, mouse TNF- α 항체가 도포된 96 well polystyrene microplate의 각 well에 표준농도의 mouse TNF- α 를 넣고 동시에 마우스 혈청을 넣었다. 이 plate를 2시간 동안 실온에 방치한 후 PBS-0.05% Tween 20으로 well을 4회 세척하였다. 여기에 다시 HRP-conjugated anti-mouse TNF- α 를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 여기에 다시 substrate chromogen solution을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1M H₂SO₄를 넣어 반응을 중지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기서 얻은 흡광도를 가지고 TNF- α 표준 농도 곡선에 대입하여 혈청 내의 TNF- α 농도를 측정하였다.

4) 배양된 비장세포의 상청액내 interleukin-10 (IL-10) 치의 측정

혈청액내 IL-10치의 측정도 R&D사(Minneapolis, MN, USA)의 mouse IL-10 ELISA kit를 이용하여 시행하였으며 방법은 manufacturer manual에 따라서 시행하였다.

7. 통 계

시기에 따른 각 군의 관절염 발생 지수는 ANOVA 검정을 이용하였으며 다중비교는 L-S-D 방법으로 하였다. 혈청내 항 collagen 항체가와 배양된 비장세포의 상층액에서 측정된 TNF- α 와 IL-10치는 Kruskal-Wallis 검정법으로 비교 분석하였으며, 두 군간의 비교는 Mann-Whitney 검정을 이용하였다. 모든 통계적 검정에서 유의기준은 p 값이 0.05 이하일 때로 하였다.

결 과

1. 관절염의 육안 및 현미경 소견

발적과 부종을 동반하는 관절염의 육안적 소견은 Fig. 1과 같았다.

2. 관절염의 중등도(Fig. 2)

아무 처치도 하지 않은 대조군은 시간이 가면서 관절염 지수가 계속해서 증가하는 양상을 보이고 있으며, acanthopanax를 투여한 군 중에서 오가피 I군 즉 diterpenoid를 투여한 군은 7주까지 관절염 지수가 약간 증가하는 것같아 보이다가 8주부터는 아무 처치도 하지 않은 대조군에 비하여 현저하게 관절염 지수가 낮은 것을 관찰할 수가 있었다(10주째 오가피 I군: 1.8 ± 0.8 , 대조군: 8.6 ± 1.7) ($p < 0.01$). 오가피 II군 즉 phenylpropanoid를 투여한 군에서는 아무 처치도 하지 않은 대조군에 대하여 관절염의 억제 효과가 약간 있는 것처럼 보이나 통계적으로는 의미가 없음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 오가피 추출물 중에서 diterpenoid는 관절염을 억제하는 효과가 뚜렷하게 있음을 알 수 있었다. 이러한 관절염의 억제 효과는 근본적인 관절염의 치료효과가 아니라 염증을 억제하는 일시적인 효과임으로 추정할 수 있는데, 그

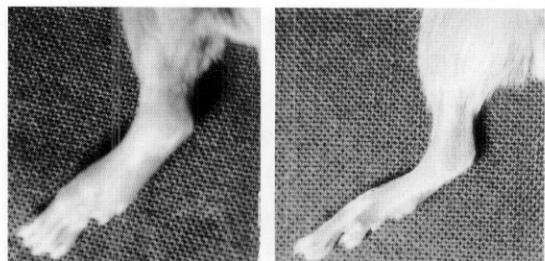


Fig. 1. A foot of a DBA/1 mouse developed collagen induced arthritis (CIA) after injection with chicken type II collagen which shows erythematous swelling (left) and a foot of mouse treated with diterpenoid which showa marked improvement of CIA (right).

이유는 data에는 표시하지 않았지만 diterpenoid를 투여한 마우스에서 10주 이후 2주간 diterpenoid를 투여하지 않고 지켜보았을 때 관절염이 급격하게 나빠지는 것을 관찰할 수 있었기 때문이다. Dexamethasone을 투여한 군에서는 대조군(10주째 8.6 ± 1.7)에 비하여 역시 의미있는 관절염지수의 감소(10주째 2.7 ± 1.1)를 관찰할 수 있었다($p < 0.01$).

3. 항 collagen 항체

항 collagen 항체치는 아무 처치도 않은 군에서는 90.5 ± 7.4 U, 오가피 I군에서는 84.0 ± 9.5 U, 오가피 II군에서는 81.0 ± 10.3 U로 의미있는 차이는 없었지만, dexamethasone을 투여한 군에서는 75.1 ± 18.1 U로 대조군에 비하여 의미있는 감소를 보였다($p < 0.05$) (Table 1).

4. 배양된 비장세포에서 IL-10의 분비

비장세포를 배양하면서 Con A로 자극하였을 때 IL-10의 분비능력은 흥미롭게도 오가피 I군에서는 의미있게 IL-10의 분비가 뚜렷하게 증가되어 있었다. 물론 오가피 II에서 IL-10의 분비가 증가되기는 하였으나 오가피 I군에 절반 수준에 이르는 것으로 나타났다(Fig. 3). Dexamethasone을 투여한 군에서도, IL-10의 분비는 현저하게 증가되어 있는 것으로 나타났다.

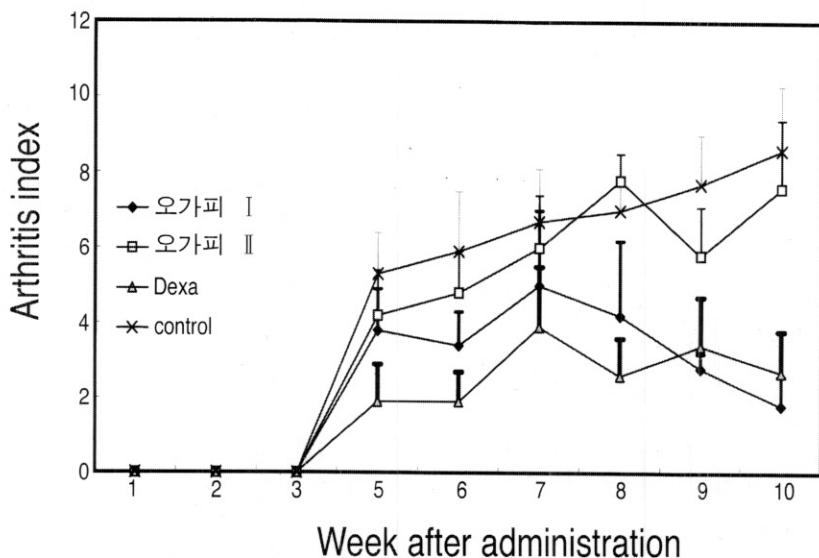


Fig. 2. Arthritis severity as a function of the week after immunization with chicken type II collagen. In diterpenoid treated group (오가피 I), suppression of arthritis was observed ($p<0.01$), but not in phenylpropanoid treated group (오가피 II). In dexamethasone treated group, suppression of arthritis was observed ($p<0.01$).

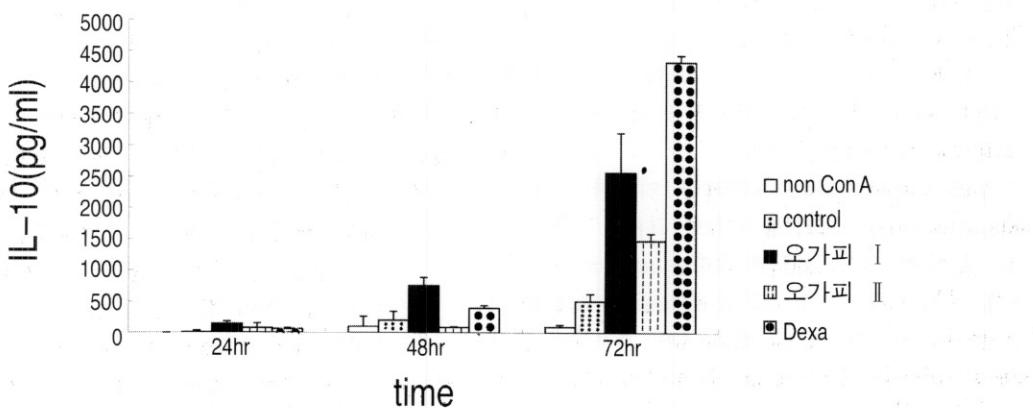


Fig. 3. Interleukin-10 (IL-10) levels in the supernatants of cultured splenocytes stimulated with Con A. Inditerpenoid treated group (오가피 I), increased secretion of IL-10 from stimulated splenocytes were observed ($p<0.01$), and also in phenylpropanoid treated group (오가피 II). The secretion of IL-10 from stimulated splenocytes in diterpenoid treated was almost double to that in phenylpropanoid treated group. In dexamethasone treated group, increased secretion of IL-10 from stimulated splenocytes was observed ($p<0.01$).

Table 1. The Levels of Anti-collagen Antibodies in Each Experimental Groups

Group	Anti-collagen Antibodies (U)
Control	90.5±7.4
Acanthopanax I	81.0±9.5
Acanthopanax II	84.0±10.3
Dexamethasone	75.1±18.1*

Values are mean±SD

*: p<0.05

5. 배양된 비장세포에서 TNF- α 의 분비

비장세포의 TNF- α 치는 모든 군에서 별로 차이를 보이지 않았을 뿐만 아니라 측정치도 모든 군에서 낮았다(data not shown).

고 찰

이번 연구에 의하면 오가피 추출물 중에서 diterpenoid는 이미 알려진 대로 항염 효과가 있는 관계로 기대했던대로 마우스에서 유발한 CIA를 효과적으로 억제하는 작용이 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 수용성 추출물의 기본이 되는 phenylpropanoid는 이전의 연구결과와 마찬가지로 마우스에서 유발한 CIA를 효과적으로 억제하는 작용이 확실하지 않는 것으로 관찰되었다.

우리나라에 자라는 오가피를 이용하여 추출한 acanthopanax 추출물을 분석한 결과를 보면, 잎에는 saponin glycoside에 속하는 acanthopanaxoside가 함유되어 있고 또 acanthoside A, B, C, D, Chiisanoid, flavononade류 등이 함유되어 있다. 줄기 성분에는 diterpenoid류, lignan 화합물(syringin, coniferin, eleutheroside E), acanthoside B, phenol 계 glycoside 류 등이 함유되어 있으며, 뿌리 성분에는 sesamin, savinin, acanthoside B, D, syringin, coniferin, falcarinol, diterpenoid 류 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

이러한 오가피 추출물이 오래전부터 류마티스 관절염과 같은 질환의 치료에 사용되어 온 것은 acanthopanax 추출물에 소염작용을 가지고 있는 성분이

함유되어 있을 것이라고 추측되어 왔다. 실제로 이¹²⁾의 보고에 의하면 acanthopanax의 추출물은 항부종작용, 모세혈관 투과성 억제작용, 백혈구 유주 억제작용 등이 있음을 보고하면서 이러한 작용기전은 prostaglandin E2, leukotriene B4, C4, D4, 및 E4의 생성을 억제하기 때문이라고 하였다. 말하자면 이 물질은 염증작용에 관여하는 물질의 생성을 억제하여 특징적인 소염작용을 나타낸다고 하였다. 결국 이 물질은 lipoxygenase와 cyclooxygenase를 억제하는 작용이 있을 것으로 추정되고 있다.

이처럼 오가피는 수많은 물질을 함유하고 있어서 실제적으로 어떠한 물질이 소염작용을 갖는지를 알기란 어렵다. 그러나 최근 들어서 Kim 등^{2,4)}의 보고에 의하면 여러 가지 함유물질 중에서 diterpenoid가 가장 강력한 소염작용이 있음을 보고하였고, 그 소염작용은 아스파린의 5배에 달하고 장점은 아스파린이나 다른 NSAIDs 와는 달리 위장장애나 다른 독성이 거의 없다고 보고하였다. 물론 이러한 부분에는 더 많은 연구가 진행되어야 할 부분으로 남아 있다.

이미 서론에서 지적한대로 저자가 이전에 연구하여 보고⁷⁾ 하기로는 오가피 추출물 중 수용성 추출물은 CIA의 치료 효과가 거의 없는 것으로 관찰하였는데 그 이유는 첫째로 실제로 acanthopanax 추출물이 CIA의 유발 및 치료에 전혀 효과가 없는 것으로 생각할 수 있고, 둘째로는 실험 10주째에 효과가 약간 있는 것으로 보아 장기 투여에 의하여 효과를 기대할 수 있던지 아니면 현재 사용한 양이 일반적으로 사람에서 추천되는 양을 체중으로 환산하여 마우스에게 투여한 것이므로 투여 양을 높이면 효과를 기대할 수 있으리라고 생각되었으며, 세 번째로는 acanthopanax 추출물이 항염, 소염작용을 가지는 것은 주로 이 추출물 속에 함유된 diterpenoid에 의한 작용이므로 수용성 추출물에는 함유되어 있지 않아서 이러한 결과가 관찰된 것이다라고 하였다. 이러한 이유로 이번 연구에서는 acanthopanax 추출물 중에서 다시 지용성 추출물 중에서도 diterpenoid를 분리하여 본 실험에 사용하였고 아울러 대조군으로 역시 수용성 추출물의 대표적인 격인 phenylpropanoid를 정제하여 함께 사용하여 보았다.

기대했던대로 diterpenoid를 투여한 마우스에서

는 CIA의 억제효과가 통계적으로 의미있게 뚜렷하게 나타난 반면에, phenylpropanoid를 투여한 군에서는 약간의 효과가 관찰되지만 통계적인 의미는 없었다. 이러한 결과는 지난번 연구에서와 마찬가지로 오가피의 수용성 추출물이 CIA 억제 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다. 또한 diterpenoid에 의한 CIA의 치료효과는 탁월한 것으로 평가되며 이러한 효과는 dexamethasone의 효과에 벼금가는 것으로 관찰되었다. 이와같이 diterpenoid가 마우스 모델에서 유발한 CIA에 뚜렷한 효과를 보인 작용기전은, 이미 알려진대로 diterpenoid가 cyclooxygenase와 lipoxygenase를 억제하는 효과로 인한 것으로 추정된다. 물론 이 부분에도 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

류마티스 관절염은 염증성질환으로 관절내에 염증성 cytokine, 예를 들면 IL-1, TNF- α , IL-6 와 같은 cytokine이 증가한다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 이들은 활마섬유모세포와 연골세포에서 collagenase 및 중성 protease를 생산케 하며, 생산된 이들 효소들은 collagen과 proteoglycan을 파괴하여 관절연골을 파괴시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다^[13-15].

또한 류마티스 관절염의 마우스 모델인 CIA의 경우에도 류마티스 관절염에서 처럼 다양한 면역담당 세포가 활성화 되어 있는 점으로 미루어 보아 cytokine은 effector molecules로서 병리 기전을 유발시키고 진행에 관여하는 중요한 인자임을 알 수 있다. 특히 CIA의 초기 및 진행단계에 있어서 염증성 cytokine인 IL-1이나 TNF- α 및 IL-6가 중요한 역할을 했이 이미 잘 알려져 있고^[10, 16-20], 이러한 염증성 cytokine에 대한 항염증성 cytokine은 interleukin-10이 중요하다는 사실은 이미 잘 알려져 있다^[21, 22]. CIA에서 T 세포의 중요성에 대해서도 이미 잘 알려져 있는데^[23, 24], T 세포 중에서도 Th2 세포는 IL-10을 분비하여 세포성 면역 중에서 Th1에 의한 자연성과민반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다.

지난번 연구^[7]에서 이들 cytokine의 혈중 농도를 측정하였으나 각 군에 따른 특별한 차이를 발견할 수가 없었다. 이러한 이유는 관절의 국소에서 진행되는 염증의 지표로 전신적인 혈중의 이들 cytokine

을 측정하는 것은 바람직하지 않다는 결론을 내렸고, 이와같은 cytokine assay를 위하여는 국소관절에서 검사하는 것이 바람직하나 실험상의 어려운 여건을 고려할 때, 마우스의 비장세포를 추출하여 배양하면서 분비되는 cytokine profile을 측정하면 말초혈액보다 정확한 면역반응계의 활성을 추정할 수 있을 것으로 생각되었다.

염증성 cytokine은 여러 가지가 있지만 특히 근자에 들어서 류마티스 관절염의 병인론에 있어서 주목을 받고 있는 TNF- α 를 측정하고 아울러 함염증성 cytokine은 IL-10을 측정하였다. 여기서 비장세포를 자극하기 위하여 collagen을 사용하는 것이 원칙이겠으나 본 실험실의 여건상 일반적으로 림프구 자극에 사용되는 Con A를 대신 사용하기로 하였다.

먼저 TNF- α 치는 각군 공히 측정치 이하였고 각 군별로 차이는 관찰되지 않았다. 이것은 아마도 비장세포의 단핵구는 주로 림프구로 구성되어 있어서 TNF- α 의 분비가 측정치 이하인 것으로 추정되었으며 이것을 교정하기 위하여 차기 실험에서는 TNF- α 대신 INF- γ (interferon- γ)를 측정하던지 아니면 비장세포의 단핵구보다는 복강내 거식세포를 얻어서 측정하는 것이 옳을 것으로 생각되었다.

근자에 들어서 자가면역성 질환과 IL-10과의 관계가 관심을 모으고 있는데 Walmsley 등^[25]이 실험에 의하면 실험동물에서 CIA를 유발한 후 IL-10을 투여함으로 관절염의 발생률과 중등도를 감소시킨다고 하여 IL-10을 이용한 치료를 기대할 수 있는 것으로 여겨졌다.

이번 연구에서는 홍미롭게도 diterpenoid를 투여한 군에서 비장세포에서 IL-10의 분비가 증가되어 있는 것이 관찰되며 이것은 diterpenoid의 효과에 대한 기전을 설명하는데 도움이 될것으로 생각된다. 물론 dexamethasone을 투여한 경우에서도 비장세포의 IL-10분비가 증가되어 있는 것으로 나타났는데 이러한 결과는 Swain 등^[26] 및 Dandona 등^[27]의 보고에서처럼 steroid가 IL-10의 합성 및 분비를 증가시킨다는 보고를 확인하는 결과라고 생각된다. Diterpenoid도 dexamethasone 처럼 비장세포를 자극하여 IL-10 분비를 증가시키는 작용은 IL-10 분비에 대한 직접적인 영향인지 아니면 단핵구를 통한

또는 IL-2나 INF- γ 의 억제를 통한 이차적인 역할인지는 더 연구가 되어야 할 부분이라고 생각된다.

기존의 IL-10이 관절염의 억제효과를 보고한 것도 있고 또 Lapadula 등²³⁾에 의하면 류마티스 관절염에서 IL-10은 매우 중요한 역할을 한다고 보고하고 있으나 반대로 유 등²⁹⁾의 보고에 의하면 오히려 IL-10에 의하여 관절염이 악화되는 상반된 보고를 하였다. 실제로 박 등¹⁰⁾의 보고에 의하면 혈중 IL-10치는 마우스에서 CIA의 유발과 무관하다고 보고하고 있다.

흥미있는 사실은 이러한 diterpenoid는 CIA 억제에 근본적인 효과라기 보다는 일시적인 효과라는 것을 알 수 있었다. 그 이유는 data에는 보여주지 않았으나 10주 후에 diterpenoid를 끊고 2주간 마우스를 관찰하였을 때 관절염이 다시 악화되는 것을 관찰할 수 있었기 때문이다. 결국 CIA를 지속적으로 억제하기 위해서는 이 약물을 지속적으로 투여해야 한다는 사실이다.

결론적으로 acanthopanax 추출물 중 diterpenoid는 DBA/1 마우스에서 collagen induced arthritis의 유발을 억제하는 작용이 있는 것으로 보여지나 이러한 작용이 실제로 인체에서도 같은 작용을 가지고 있는지는 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결 론

DBA/1 마우스에서 chicken type II collagen로 collagen induced arthritis를 유발시키고 acanthopanax 추출물 중 diterpenoid와 phenylpropanoid를 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. acanthopanax 추출물 중 diterpenoid는 마우스에서 유발된 관절염을 억제하는 작용이 있었다.

2. acanthopanax 추출물 중 phenylpropanoid는 관절염 억제작용이 없었다.

3. acanthopanax 추출물 중 diterpenoid를 투여한 마우스의 비장세포에서 IL-10의 생산이 다른 군에 비하여 현저하게 증가되어 있었다.

이와같은 결과로 acanthopanax 추출물 중 diterpenoid는 관절염의 억제작용이 있으며 이와같은 작용은 IL-10과 같은 항염 싸이토카인의 증가에 의한

효과가 일부 관여하는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) 유향수. 한국목초학. 계축문화사 서울 p261, 1981
- 2) Kim YH, Ryu JH, Chung BS. Diterpene glycoside from Acanthopanax koreanum. Korean J Pharmacol 1990;21:49-51
- 3) Kim YH, Hyunn SH, Kim HS, Lee SW, Kim DH, Lee JJ. Microbial transformation of bioactive diterpenoids from Acanthopanax koreanum by Fusarium oxysporum. J Microbiol Biotechnol 1992;2:92-7.
- 4) Kim YH, Kim HS, Lee SW, Uramoto M, Lee JJ. Kaurane derivatives from Acanthopanax koreanum. Phytochemistry 1995;39:449-51
- 5) 김동집, 박동준, 류마티스관절염의 병인. 대한류마티스학회지 1994;1:1-12.
- 6) ACR AD HOC Committee on Clinical Guidelines toid arthritis. Arthritis Rheum 1996;39:713-22.
- 7) 김동수. 마우스에서 콜라겐 유도성 관절염 발생에 비치는 Acanthopanax 추출물의 영향. 대한류마티스학회지 1998;5:5:45-55.
- 8) Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. Short analytical review, collagen induced arthritis as a model of rehumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol 1994;73:11-8.
- 9) Wooley PH. Collagen induced arthritis. In: Sabato G, editor. Methods in Enzymology Vol 162. New York: Academic Press; 1988. p. 361-73.
- 10) 박승규, 이지언, 정일엽, 최용경, 최인성, 김효준. DBA/1JCRI Mouse 에 있어서 콜라겐 유도 관절염에 관한 면역학적 고찰. 대한면역학회지 1996;18:437-45.
- 11) 윤광재. 한국산 오가파속 식물의 열매, 잎의 성분 및 항암 효과에 관한 연구. 경희대학 교 박사학위 논문, 1994.
- 12) 이영순, 섭오갈피나무 성분(-)-Pimara-9(11), 15-diene-19-oic acid 의 약리학적 연구. 서울대학교 박사학위논문, 1989.
- 13) Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokin inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990;33:305-15.
- 14) Jacob CO. Tumor necrosis factor- α in autoimmunity: pretty girl or old witch? Immunol

— 김동수 외 : 마우스에서 collagen induced arthritis 발생에 미치는 diterpenoid의 영향 —

- Today 1992;13:122-5.
- 15) Le J, Vilcek J. Biology of disease : Interleukin 6: multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. Lab Invest 1989;61:588-602.
 - 16) Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA, Townes AS. Acceleration of collagen induced arthritis by intra-articular injection of tumor necrosis factor or transforming growth factor-beta. Clin Exp Immunol 1992;89:244-50.
 - 17) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor- α : A predictive genetic model of arthritis. EMBO J 1991;10:4025-31.
 - 18) Marcelletti JF, Ohara J, Katz DH. Collagen-induced Arthritis in mice. Relationship of collagen-specific and total IgE synthesis to disease. J Immunol 1991;147:4185-91
 - 19) Takai Y, Seki N, Senoh H, et al. Enhanced production of interleukin-6 mice with type II collagen -induced arthritis. Arthritis Rheum 1989;32:594-600.
 - 20) Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Antitumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89: 9784-8
 - 21) Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995; 38:96-104.
 - 22) Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. J Clin Invest 1995;95:2868-76.
 - 23) Feterman GM, Spencer C, Sperling AI, Bluestone JA. Role of T cells in murine collagen-induced arthritis. J Immunol 1993;151:6546-58.
 - 24) Tada Y, Ho A, Koh D, Mak TW. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8- deficient mice ; CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. J Immunol 1996;156:4520-6.
 - 25) Walmsley M, Katsikis PD, Abney E. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 1996;39:495-503.
 - 26) Swain MG, Appleyard C, Wallace J, Wong H, Le T. Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis. Am J Physiol 1999;276:199-205.
 - 27) Dandona P, Aljada A, Garg R, Mohanty P. Increase in plasma interleukin-10 following hydrocortisone injection. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:1141-4.
 - 28) Lapadula G, Lannone F, Dell' Accio F, Covelli M, Pipitone V. Interleukin-1- in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 1995;13:629-32,
 - 29) 유 번, 김 찬, 최승원, 김미정, 오순환, 문희범, 백서의 콜라겐 유도성 관절염 발생이 미치는 interleukin-10의 영향. 대한류마티스학회지 1997;4:111-20.