

마우스에서 콜라겐 유도성 관절염 발생에 미치는 Acanthopanax 추출물의 영향

연세대학교 의과대학 소아과학교실

김 동 수

— Abstract —

The Effect of Acanthopanax Koreanum Extract on the Induction of Collagen Induced Arthritis for DBA/1J Mice

Dong Soo Kim

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, 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. We conducted this study whether the Acanthopanax koreanum extract has a preventive and/or regressive effect of collagen induced arthritis in DBA/1J mice.

Methods : Three groups of BDA/1J mice were immunized by intradermal injection of 5mg/kg bovine type II collagen with complete Freund's adjuvant. Group II received 20mg/kg of Acanthopanax koreanum extract orally twice weekly and group III received 1mg/kg dexamethasone intraperitoneally twice weekly. Group II and III were divided into two subgroups respectively(Group II-A, II-B, III-A and III-B). Subgroup A is prevention group(Drugs were started to be given 3 weeks after immunization) and subgroup B is suppression group(Drugs were started to be given 6 weeks after immunization when CIA had been developed already). Group I received no treatment. The prevalence of arthritis were assessed twice weekly. Serum anti-collagen antibody and splenic mononuclear cell stimulation indices(SI) to collagen were measured. Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-10 levels were also measured by ELISA.

* 본 연구는 1997년도 보건복지부 연구비에 의하여 이루어졌음.

Result : Collagen induced arthritis(CIA) started to develop 4 weeks after collagen injections. In *Acanthopanax koreanum* extract treated group, CIA induction seemed not to be inhibited, but questionably partial suppressive effect of arthritis were observed at 10 weeks after collagen injection. In dexamethasone treated group, both of prevention and suppression of CIA could be observed. Levels of anti-collagen antibodies were reduced in dexamethasone treated group, but not in the *Acanthopanax koreanum* extract treated group. No significant differences of splenic mononuclear cell SI among the groups was observed. There were no significant differences in the levels of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-10 among the groups.

Conclusions : These findings showed that the *Acanthopanax koreanum* extract does not have a definite effect on induction or suppression of CIA.

Key Words : Collagen induced arthritis, Tumor necrosis factor- α , Interleukin-10, *Acanthopanax koreanum* extract

서 론

오가피 또는 오갈피라고 불리는 식물은 오가피과에 속하는 낙엽활엽관목으로서 인삼 및 두릅과 같은 과에 속하고 잎이 인삼과 산삼의 잎과 구분이 잘 되지 않을 정도로 같은 모양이며 우리나라를 비롯해서 동양에서는 오래전부터 약재로 사용되어 오고 있다. 우리나라에서 자생되고 있는 오가피는 *Acanthopanax koreanum*이라는 학명으로 불리우고 이 *Acanthopanax koreanum*은 다시 그 잎모양이나 가지 등의 모양에 따라 약 10여종으로 다시 분류되고 있다⁶.

*Acanthopanax*의 추출물의 성분은 뿌리, 줄기 및 잎에 따라 다른 것으로 알려져 있으며 현재 우리나라에서 사용되고 있는 소위 오가피 추출물은 이들이 혼합되어 있는 것이다. 이러한 오가피 추출물의 효과는 여러 가지가 있지만 그 중에서 소염효과가 탁월하여 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에 사용되어 왔다. 최근들어 Kim 등¹⁶⁻¹⁸에 의하면 이러한 추출물 중에서 diterpenoid류가 소염작용을 보이는 가장 중요한 성분이라고 보고하고 있다. 이들의 보고에 의하면 *acanthopanax*에서 추출된 diterpenoid류는 아스피린에 비하여 최소 5배 이상

의 강력한 소염, 진통 작용이 있음을 보고하였으며, 이러한 작용의 기전은 염증성 물질의 매개체인 prostaglandin이나 leukotriene의 생성과정을 차단하는 것으로 생각된다고 보고하였다. 이러한 기전은 기존의 류마티스 관절염의 치료제로 사용되는 NSAID계통의 약물과 유사한 것으로 생각되며, 실제로 류마티스 관절염에 사용될 수 있는 가능성을 생각할 수 있다.

류마티스 관절염은 아직까지도 그 원인이 불분명한 질환으로 우리나라에도 많은 환자들이 고통을 받고 있다¹¹. 류마티스 관절염의 치료는 원인이 불분명하기 때문에 특별한 치료는 없고 다양한 항염제제들 소위 nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs)이 사용되고 있으며 일차적으로 이들 NSAID에 반응하지 않은 경우에는 2차적으로 disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs)를 사용하고 그외 다양한 실험적인 약물들이 사용되고 있는 실정이다⁷. 이러한 상황은 결국 어느 하나 가장 좋은 치료약물이라는 것이 없다는 것이다. 이들 약물들은 다양한 부작용을 보이고 있기 때문에 이러한 부작용을 적게하고 항염 작용은 극대화하려는 노력이 계속되고 있는 실정이다.

저자는 이러한 *acanthopanax* 추출물이 과연 류마티스 관절염 치료제로 사용될 수 있는지의 가능성

을 조사하기 위하여 먼저 류마티스 관절염의 대표적인 동물모델인 DBA/1J 마우스를 이용한 collagen induced arthritis(CIA)를 유발하면서, acanthopanax 추출물을 투여할 때 CIA의 유발 방지효과가 있는지를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

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

2. Acanthopanax 추출물

Acanthopanax 추출물은 주식회사 초림농산(서울, 한국)으로부터 공급받아 사용하였다. 제조방법을 간단히 요약하면 오갈피나무의 줄기와 잎을 수증기 증류장치에 넣고 증류수를 가하여 4시간 동안 수증기를 증류하여 얻은 것을 냉동건조하여 분말상태로 공급받아 사용하였다.

3. CIA의 유발

기존의 방법에 따라^{11,25)} 분리정량된 chicken type II collagen(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 0.01N 아세트산에 녹여 2mg/ml의 농도가 되도록 한 후 4℃에서 18시간 정도 저어준 다음 동량의 complete Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞어 emulsion으로 만들었다. 이를 100μ씩 마우스 꼬리의 기시부근에 피내주사하였고 처음 주사한 지 3주와 6주 후 동일한 방법으로 추가접종하였다.

4. 실험군

실험동물은 3개군으로 나누었고 각군은 20마리였다. 제 I군은 collagen을 투여하여 관절염을 유발시키면서 아무런 처치를 하지 않았고, 제 II군은 collagen을 접종하여 관절염을 유발시키면서 acanthopanax 추출물을 경구로 1주에 2회(20mg/kg) 투여하였으며, 제 III군은 collagen을 투여하면서 동시에 dexamethasone(1mg/kg)을 복강내로 주 2회 투

여하였다. 제 II군과 III군은 다시 두군으로 나누어 실험 시작 3주 후부터 dexamethasone이나 acanthopanax 추출물을 투여한 군(IIA군 및 IIIA군, 예방효과를 측정)과 실험 시작 6주 후부터 투여한 군(II B군 및 III B군, 치료효과를 측정)으로 나누었고 각군은 10마리였다. 이들은 모두 실험 시작 후 9주까지 투여하였고 관절염의 발생과 중증도는 10주까지 관찰하였다.

5. 관절염 발생률과 중증도의 평가

주 2회 육안으로 발의 발적과 부종 및 기형의 발생 유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 발생률 및 중증도를 조사하였다. 관절염의 중증도는 일반적인 육안검사를 통하여 실시하였다²⁾. Score 0는 발에 아무런 질환이 발견되지 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

6-1) 항 collagen 항체치

실험 10주째에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 측정 시까지 검체는 영하 70℃에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 항 collagen 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(10μg/ml)을 가하여 4℃에서 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 1시간 동안 반응시

킨 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 1시간 동안 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 substrate를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 450nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 검체의 항 collagen 항체치 측정은 2차례 시행하여 평균값을 얻었다. 예비실험에서 심한 CIA를 소견을 보인 DBA/1J 마우스 마리의 혼주혈청의 값을 100 unit로 정하였고 흡광도와 unit 간에는 직선형의 상관관계를 확인하였으며, 이때 정상 마우스에서는 항 collagen항체가 검출되지 않았다.

6-2) 비장 단핵세포 자극 지수

세포 면역 반응의 평가를 위해 비장 단핵세포의 collagen 항원에 대한 자극 지수를 측정하였다. 방법을 요약하면, 실험 10주째 동물을 희생한 후 비장을 무균적으로 적출하여 주변의 조직을 제거한 후 PBS로 수 차례 세척하였다. 비장 조직을 잘게 잘라 Hank's balanced salt solution(HBSS, containing 10mM HEPES, pH 7.4)에 넣어 세포를 부드럽게 분리시킨 후 무균 거즈에 걸러 응괴를 제거하였다. 걸러진 세포 부유액은 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 2×10⁶ cell/ml 농도로 만든 후 멸균된 well plate에 각 well당 100 μl씩 넣었다. 각 well에 collagen 용액(25 μg/ml) 100 μl를 넣은 후 5% CO₂ 배양기에서 37℃를 유지하며 96시간 동안 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 0.5 μCi(³H)-thymidine를 가한 후 cell harvester를 사용하여 glass fiber filter 위에 harvest 하였다. 배양 후 베타측정기로 세포내에 결합된 (³H)-thymidine을 측정하여 자극 지수(stimulation index, SI)를 다음과 같이 계산하였다.

$$SI =$$

$$\frac{\text{mean CPM of } (^3\text{H}) \text{ TdR in collagen stimulated culture}}{\text{mean CPM of } (^3\text{H}) \text{ TdR in unstimulated culture}}$$

6-3) 혈청 TNF-α의 측정

실험 10주째에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 측정시까지 검체는 영하 70℃에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 혈청 TNF-α를 R & R사(Minneapolis, MN, USA)의 mouse TNF-α ELISA kit로 manufacturer manual의 방법에 따라 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, mouse TNF-α 항체가 도포된 96 well polystyrene microplate의 각 well에 표준농도의 mouse TNF-α를 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-α를 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 450nm 에서 흡광도를 측정하였다. 여기서 얻은 흡광도를 가지고 TNF-α 표준농도 곡선에 대입하여 혈청내의 TNF-α 농도를 측정하였다.

6-4) 혈청 interleukin-10(IL-10)치의 측정

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

7. 통계

시기에 따른 각 군의 관절염 발생률은 Fisher's exact test 검정법으로 사용하였다. 항 collagen 항체 및 비장 단핵세포의 자극 지수, 그리고 혈중 TNF-α와 IL-10치는 chi square test 검정법으로 비교 분석하였다. 모든 통계적 검정에서 유의기준은 p 값이 0.05 이하일 때로 하였다.

결 과

1. 관절염의 육안 및 현미경적 소견

발적과 부종을 동반하는 관절염의 육안적 소견은 Fig. 1과 같았다. 10주 후 채취한 CIA관절의 조직

Fig. 1. Fore feet of a DBA/1J mouse before development of collagen induced arthritis(lower) and erythematous swelling after chicken type II collagen immunization(upper).

Fig. 2. Histology of the collagen induced arthritic foot showing marked infiltration of mononuclear cells in the synovium and destructive change of arthritic surface(H & E).

학적 소견은 주로 단핵구들로 구성된 많은 세포의 침윤과 골의 파괴를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

2. 관절염 발생율

관절염의 발생은 dexamethasone을 3주째부터 투여하기 시작한 군을 제외하고 모든 실험동물군에서 항원접종 후 4주에서부터 발견되기 시작하였다. 아무런 처치없이 collagen만 투여한 군에서는 시간이 경과하면서 관절염 발생율이 증가하여 접종후 7

주에서부터는 모든 실험 동물에서 관절염이 발생하였다.

*Acanthopanax*추출물을 투여한 군에서는 접종후 3주째부터 투여한 군이나 접종후 6주째부터 투여한 군이나 관절염 발생율의 차이 없이 접종후 4주째부터 관절염 발생이 시작되고 접종후 7주부터는 모든 실험동물에서 관절염이 발생하였으며 이러한 소견은 아무 처치도 하지 않은 군과도 관절염의 발생율에 있어서는 의미있는 차이가 없었다.

Dexamethasone을 접종 후 3주째부터 투여한 군에서는 접종 5주 후에 관절염이 발생하기 시작하여 8주째는 30%의 발생율을 보이고 더 이상의 증가는 관찰할수 없었다($p < 0.05$). Dexamethasone을 접종 후 6주째부터 투여한 군에서는 오가피 투여군이나 아무것도 투여하지 않은 군에서 처럼 접종 4주 후에 관절염이 발생하기 시작하여 5주째 이후부터는 30% 이상의 관절염 발생의 증가는 관찰할 수 없었다($p < 0.05$).

이 결과에 의하면 dexamethasone을 투여한 군에서는 다른 두 군에 비하여 의미있는 관절염의 유발을 억제하는 것으로 보였으나($p < 0.05$) *acanthopanax*를 투여한 군에서는 관절염 발생의 유발을 억제하는 작용은 없는 것으로 보였다(Fig. 3).

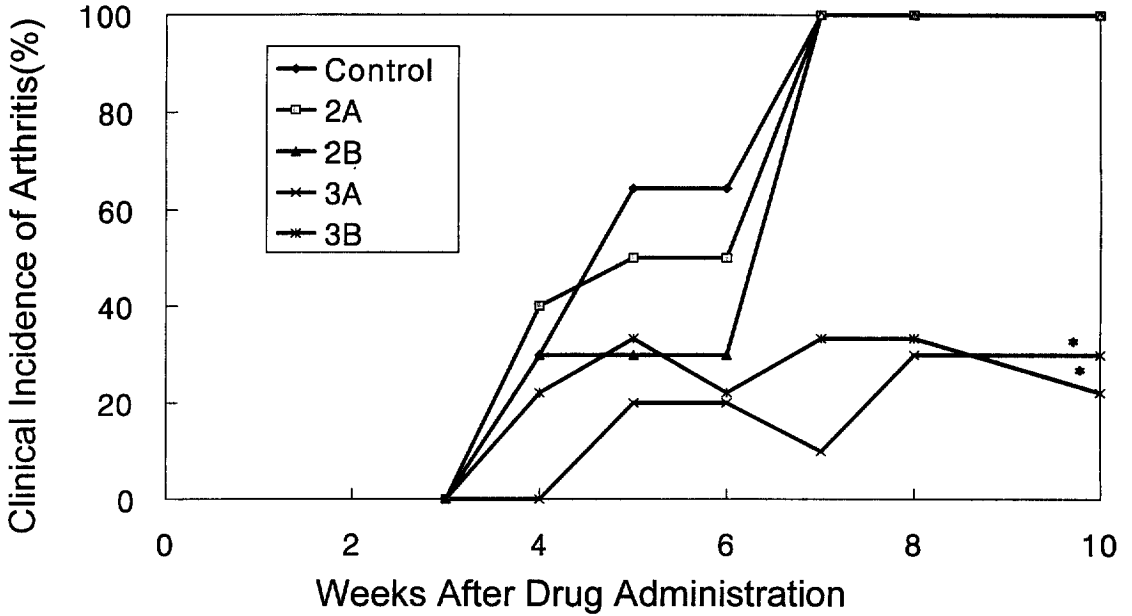


Fig. 3. Incidence of arthritis in each group during experiment after immunization with type II collagen. The incidence of arthritis was high in control, acanthopanax prevention(II A) and acanthopanax suppression(II B) groups at week seven. The incidence of arthritis was persistently lower in dexamethasone prevention group(III A) and suppression(III B) groups (*:p<0.05).

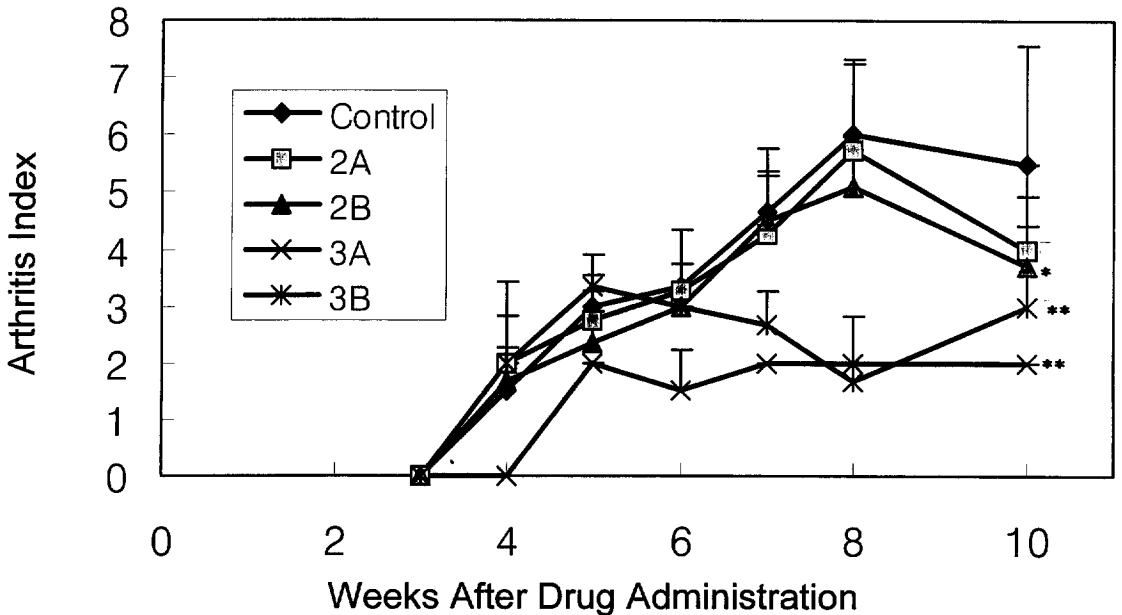


Fig. 4. Arthritis severity as a function of the week after immunization with type II collagen. In acanthopanax treated group(II A and II B), suppression of arthritis were observed at 10 weeks after type II collagen injection (*:p<0.05). In dexamethasone treated group, both of prevention(III A) and suppression(III B) of CIA could be observed(**:p<0.01).

3. 관절염의 중등도 (Fig. 4)

아무 처치도 하지 않은 대조군은 시간이 가면서 관절염 지수가 계속해서 증가하는 양상을 보이고 있으며, acanthopanax를 투여한 군에서는 10주째에는 관절염 지수가 감소하는 것처럼 보였다. 그러나 실험 시작 후 3주째부터 acanthopanax를 투여한 군에서는 대조군에 비하여 의미있는 감소가 아니었으나, 실험 시작 후 6주째부터 acanthopanax를 투여한 군에서는 10주째에만 대조군 (5.5±1.9)에 비하여 의미있는 관절염지수의 감소를 보여 주었다 (3.7±1.3) (p<0.05).

Dexamethasone을 3주째부터 투여한 군에서는

Table 1. The Levels of anti-collagen antibodies in each experimental groups.

Groups	Anti-collagen antibody
Control	92.5 ± 7.4
Acanthopanax prevention	84.9 ± 9.6
Acanthopanax suppression	80.8 ± 16.3
Dexamethasone prevention	69.1 ± 20.1*
Dexamethasone suppression	61.4 ± 24.3*

Values are mean±SD. * : p<0.05

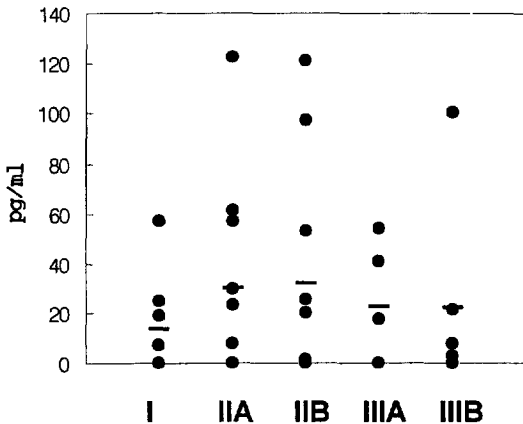


Fig. 5. Serum tumor necrosis factor- α levels in each experimental groups (I : control, II A : acanthopanax prevention group, II B : acanthopanax suppression group, III A : dexamethasone prevention group, III B : dexamethasone suppression group).

대조군 (5.5±1.9)에 비하여 의미있는 관절염 지수의 감소 (3.0±1.4)를 관찰할 수 있었고 (p<0.01), 6주째부터 투여한 군에서는 7주째부터 의미있는 관절염 지수의 감소를 관찰할 수 있었다 (2.7±0.8) (p<0.01).

4. 항 collagen 항체

항 collagen 항체치는 아무 처치도 하지 않은 군에서는 92.5 unit, 3주째부터 acanthopanax를 투여한 군에서는 84.9 unit, 6주째부터 acanthopanax를 투여한 군에서는 80.8 unit로 의미있는 차이는 없었지만, dexamethasone을 3주째부터 투여한 군에서는 69.1 unit, dexamethasone을 6주째부터 투여한 군에서는 61.4 unit 대조군에 비하여 의미있는 감소를 보였다 (p<0.05) (Table 1).

Table 2. Stimulation indices of splenic mononuclear cells to chicken type II collagen.

Groups	SI by type II collagen
Control	2.1 ± 0.9
Acanthopanax prevention	1.9 ± 1.2
Acanthopanax suppression	2.0 ± 0.8
Dexamethasone prevention	2.0 ± 0.9
Dexamethasone suppression	1.8 ± 1.1

Values are mean±SD. SI : Stimulation index. (p>0.05)

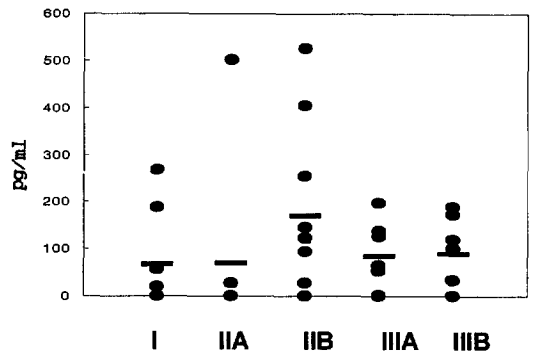


Fig. 6. Serum interleukin-10 levels in each experimental groups (I : control, II A : acanthopanax prevention group, II B : acanthopanax suppression group, III A : dexamethasone prevention group, III B : dexamethasone suppression group).

5. 비장 단핵세포 자극지수

비장 단핵세포의 collagen 항원에 대한 자극지수는 대조군이 2.1, 실험 3주째 acanthopanax 투여군이 1.9, 실험 6주째 acanthopanax 투여군이 2.0, 실험 3주째 dexamethasone 투여군이 2.0, 실험 6주째 dexamethasone 투여군이 1.8로 각군 사이의 차이를 보이지 않았다(Table. 2).

6. 혈청 TNF- α 치와 혈청 IL-10치

혈청 TNF- α 치와 IL-10치는 세 군 공히 의미있는 차이는 없었다(Fig. 6, 7).

고 찰

우리나라에서 자라는 오가피를 이용하여 추출한 acanthopanax 추출물은 잎, 줄기, 뿌리별로 성분이 다른 것으로 보고되어 있다. 잎 성분에는 acanthopanaxoside 로 saponin glycoside에 속하고, acanthoside A, B, C, D, Chiisonide, flavonoade류 등이 함유되어 있고, 줄기 성분에는 diterpenoid류, lignan 화합물(syringin, coniferin, eleutheroside E), acanthoside B, phenol계 glycoside류 등이 함유되어 있으며, 뿌리성분에는 sesamin, savinin, acanthoside B, D, syringin, coniferin, falcarinol, diterpenid류, 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

이러한 오가피 추출물이 오래전부터 류마티스 관절염과같은 질환의 치료에 사용되어 온 것은 acanthopanax 추출물에 소염작용을 가지고 있는 성분이 함유되어 있을 것이라고 추측되어 왔다. 실제로 이⁹⁾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 주된 물질의 생성을 억제하여 특징적인 소염작용을 나타낸다고 하였다. 결국 이 물질은 lipoxxygenase와 cycloxygenase를 억제하는 작용이 있을 것으로 추정되고 있다.

이처럼 오가피는 수많은 물질을 함유하고 있어서

실제적으로 어떠한 물질이 소염작용을 갖는지를 알기란 어렵다. 그러나 최근들어서 Kim 등¹⁶⁻¹⁸⁾의 보고에 의하면 diterpenoid가 가장 강력한 소염작용이 있음을 보고하였고 소염작용은 아스피린의 5배에 달하고 장점은 아스피린이나 다른 NSAID와 달리 위장장애나 다른 독성이 거의 없다고 하였다. 이러한 부분에 관하여는 더 많은 연구가 진행되어야 할 부분으로 남아 있다.

그러나 이번 연구에 의하면 acanthopanax 추출물을 투여한 군에서 대조군에 비하여 의미있게 collagen induced arthritis(CIA)의 유도가 억제되는 것과같은 양상을 보이지는 않았다. Acanthopanax를 투여하는 방법을 두가지로 시행하였는데 실험 시작 후 3주째부터 투여한 군은 CIA의 유도를 억제할 수 있는 기능이 있는지를 알아보기 위하여 시행한 것이고, 실험 시작 후 6주째부터 투여한 군은 이미 발현된 CIA를 호전시킬 수 있는지 말하자면 치료효과가 있는지를 알아보기 위하여 시행하였으나 두 군 모두에서 별다른 효과를 관찰할 수 없었다. 단지 실험 10주째가 되어서 치료효과를 보는 군에서만 의미 있는 효과가 있는 것처럼 보였는데 이것은 아마도 acanthopanax가 효과가 있다면 장기 투여에 의하여서만이 효과를 보일 수 있다는 점을 시사할 수 있으므로 이 부분에 대하여는 더 연구가 되어야 할 것으로 생각되며 관찰기간을 연장하여 연구해야 할 것으로 생각된다.

그러나 문제는 치료군 보다도 3주 이상 acanthopanax를 더 투여한 CIA억제군에서는 관절염지수가 감소된 것처럼 보여도 통계적인 의미가 없는 것으로 나타난 점이다. 그러므로 acanthopanax를 장기적으로 투여할 때 효과가 있을 가능성이 있을 것 같다는 설명은 맞지 않는 것으로 보인다. 이 부분에 대하여는 현재로서는 어떠한 설명을 하기가 어렵다. 단지 여기서 밝혀두고 싶은 것은 acanthopanax를 투여할 때 효과가 있을 것이라는 bias를 배제하기 위하여 두 사람이 함께 관절염 지수를 평가하여 의견을 모은 다음에 평가하였고, 또한 연구자는 개인적으로 acanthopanax가 치료효과가 없을 것이라는 생각을 하고 있었기 때문에 bias는 전혀 없었을 것으로 생각된다. 이 점에 관하여는 반복 실험과 더 많은 대상을 통하여 조사되어야 할 부분으로 생각된다.

결과적으로 한방에서 효과가 있다는 설명을 우리가 그대로 받아들일 수는 없지만 본 실험에서 *acanthopanax* 추출물이 CIA의 유발 및 치료에 효과가 뚜렷하지 않은 점은 몇가지로 생각할 수 있다.

첫째는 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 있든지 아니면 현재 사용한 양이 일반적으로 사람에서 추천되는 양을 채중으로 환산하여 마우스에게 투여한 것이므로 투여 양을 높이면 효과를 기대할 수 있으리라고 생각된다. 그러나 이부분에 대하여는 다양한 양의 실험군으로 나누어 조사할 여지를 남겨두고 있다. 세번째로는 *acanthopanax* 추출물이 항염, 소염작용을 가지는 것은 주로 이 추출물 속에 함유된 diterpenoid에 의한 작용이라는 보고가 있는 것은 앞서 기술한 바와 같다. 그런데 이 diterpenoid는 지용성이기 때문에 우리가 사용한 추출물에는 거의 함유되어 있지 않기 때문에 효과가 뚜렷하지 않은 것으로 생각할 수 있다. 이 부분에 대하여는 *acanthopanax* 추출물 중에서 다시 지용성 추출물을 분리하여 본 실험을 하여 규명해 볼 필요가 있다.

CIA에서 T 세포의 중요성에 대해서는 이미 잘 알려져 있다^{12,21}). 세포성면역에 대한 *acanthopanax*의 영향을 관찰하기 위하여 비장세포의 자극지수를 관찰한 결과 각 군간에 특별한 차이를 보이지 않은 것으로 보아 세포성면역에 미치는 효과는 거의 없는 것으로 생각되었다. 그러나 실제적으로 항원특이 T 세포를 가지고 실험하는 것이 더 정확한 방법이므로 이 결과만 가지고는 *acanthopanax*가 세포성면역에 미치는 효과를 언급한다는 것은 무리가 있을 것으로 생각된다.

류마티스 관절염은 염증성질환으로 관절 내에 염증성 cytokine, 예를들면 interleukin-1, tumor necrosis factor- β , interleukin-6와 같은 cytokine이 증가한다는 것은 이미 잘 알려져 있다^{8,13,19}). 이들은 활막섬유모세포와 연골세포에서 collagenase 및 중성 protease를 생산케 하며, 생산된 이들 효소들은 collagen과 proteoglycan을 파괴하여 관절연골을 파괴시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

또한 collagen induced arthritis의 경우에도 류

마치스관절염에서처럼 다양한 면역담당세포가 활성화 되어 있는 점으로 미루어보아 cytokine은 effector molecules로서 병리기전을 유발시키고 진행에 관여하는 중요한 인자임을 알 수 있다. 특히 CIA의 초기 및 진행단계에 있어서 염증성 cytokine인 interleukin-1이나 tumor necrosis factor- β 및 interleukin-6가 중요한 역할을 함이 이미 잘 알려져 있고^{2,9,15,20,22,24}), 이러한 염증성 cytokine에 대한 항염증성 cytokine은 interleukin-10이 중요하다는 사실은 이미 잘 알려져 있다^{10,14}). 물론 국소 관절에서 cytokine의 생성이 증가된다고 하더라도 말초혈액중에서 반드시 cytokine 농도가 증가되는 것은 아니다. 그러나 혈중에 증가된 염증성 cytokine은 염증부위의 염증정도를 어느정도 반영할 것으로 생각되어 저자들은 본 연구에서 마우스의 혈중내 염증성 cytokine과 항염증성 cytokine을 조사해 보기로 하였다.

물론 이와같은 cytokine assay를 위하여 국소관절 이외에 마우스의 비장세포를 추출하여 배양하면서 콜라겐 항원으로 자극하여 분비되는 cytokine profile을 측정하면 말초혈액보다 정확한 면역계의 활성을 추정할 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서는 여기까지 실험을 확장하지 않은 것은 다른 보고자들^{2,10,14})에서와 마찬가지로 혈청의 cytokines을 측정하여 마우스 생체내 면역계의 활성화를 간접적으로 평가하고자 하였다.

염증성 cytokine은 여러 가지가 있지만 특히 근자에 들어서 류마티스 관절염의 병인론에 있어서 주목을 받고 있는 tumor necrosis factor- β (TNF- α)를 측정하고 아울러 항염증성 cytokine은 interleukin-10을 측정하였으나 각군 사이에 TNF- α 와 IL-10치의 차이는 관찰되지 않았다.

근자에 들어서 자가면역성 질환과 IL-10과의 관계가 관심을 모으고 있는데 Walmsley 등²³)의 실험에 의하면 실험동물에서 CIA를 유발한 후 IL-10을 투여함으로써 관절염의 발생률과 중증도를 감소시킨다고 하여 IL-10의을 이용한 치료를 기대할 수 있는 것으로 여겨졌다. 그러나 유 등³)의 보고에 의하면 오히려 IL-10에 의하여 관절염이 악화 되는 상반된 보고를 하였다. 실제로 박 등²)에 의하면 혈중 IL-10치는 마우스에서 CIA의 유발과 무관하다는 보고도 있다.

이와같은 결과들을 종합해 보면 앞서 기술한 대로 혈중의 cytokine치가 염증을 동반한 국소부위의 cytokine치와 반드시 비례하지는 않는다는 것을 알 수 있다. 유 등²⁾의 보고에서도 dexamethasone을 투여한 군에서 관절염의 발생 및 중등도가 감소함에도 불구하고 혈중 IL-10치는 대조군과 차이가 없는 것은 본 연구의 결과와도 일치하고 있다.

결론적으로 acanthopanax 추출물은 DBA/1J 마우스에서 collagen induced arthritis의 유발을 억제하는 작용은 확실하지 않으나, 항염증작용이 강력한 것으로 알려진 acanthopanax 추출물 중 지용성 물질인 diterpenoid류를 가지고 더 많은 연구가 되어야할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) 김동집, 박동준 : 류마티스관절염의 병인. 대한류마티스학회지 1:1-12, 1994
- 2) 박승규, 이지연, 정일엽, 최용경, 최인성, 김효준 : DBA/1JCrj Mouse에 있어서 콜라겐 유도 관절염에 관한 면역학적 고찰. 대한면역학회지 18:437-445, 1996
- 3) 유 빈, 김 찬, 최승원, 김미정, 오순환, 문희범 : 백서의 콜라겐 유도성 관절염 발생에 미치는 interleukin-10의 영향. 대한류마티스학회지 4:111-120, 1997
- 4) 육창수 : 한국목초학. 계축문화사 서울 p261, 1981
- 5) 윤광재 : 한국산 오가피속 식물의 열매, 잎의 성분 및 항암 효과에 관한 연구. 경희대학교 박사학위 논문, 1994
- 6) 이영순: 섬오갈피나무 성분 (-)-Pimara-9(11), 15-diene-19-oic acid의 약리학 적 연구. 서울대학교 박사학위 논문, 1989
- 7) ACR AD HOC Committee on Clinical Guidelines : Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 39:713-722, 1996
- 8) Arend WP, Dayer JM : Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 33:305-315, 1990
- 9) 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 89:244-250, 1992
- 10) Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K, Lipsky PE : Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 38:96-104, 1995
- 11) Durie FH, Fava RA, Noelle RJ : Short analytical review, collagen induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol 73:11-18, 1994
- 12) Feterman GM, Spencer C, Sperling AI, Bluestone JA : Role of T cells in murine collagen-induced arthritis. J Immunol 151:6546-6558, 1993
- 13) Jacob CO : Tumor necrosis factor- in autoimmunity:pretty girl or old witch? Immunol Today 13:122-125, 1992
- 14) 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 95:2868-2876, 1995
- 15) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G : Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor : A predictive genetic model of arthritis. EMBO J 10:4025-4031, 1991
- 16) Kim YH, Ryu JH, Chung BS : Diterpene glycoside from Acanthopanax koreanum. Korean J Pharmacol 21:49-51, 1990
- 17) Kim YH, Hyun SH, Kim HS, Lee SW, Kim DH, Lee JJ : Microbial transformation of bioactive diterpenoids from Acanthopanax koreanum by Fusarium oxysporum. J Microbiol Biotechnol 2:92-97, 1992
- 18) Kim YH, Kim HS, Lee SW, Uramoto M, Lee JJ : Kaurane derivatives from Acanthopanax koreanum. Phytochemistry 39:449-451, 1995
- 19) Le J, Vilcek J : Biology of disease: Interleukin 6: multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. Lab Invest 61:588-602, 1989
- 20) Marcelletti JF, Ohara J, Katz DH : Collagen-induced arthritis in mice. Relationship of collagen-specific and total IgE synthesis to disease. J Immunol 147:4185-4191, 1991

- 21) 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* 156:4520-4526, 1996
- 22) Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hamaoka T, Fujiwara H : Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 32:594-600, 1989
- 23) Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, et al : Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 39:495-503, 1996
- 24) Williams RO, Feldmann M, Maini RN : Antitumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9784-9788, 1992
- 25) Wooley PH : Collagen induced arthritis, in *Methods in Enzymology* Vol 162, eds. Sabato G, p361-373(1988), Academic Press