Journal of Korean Medicine Rehabilitation Vol. 32 No. 3, July 2022
pISSN 1229-1854 eISSN 2288-4114
https://doi.org/10.18325/jkmr.2022.32.3.1

Original Article

콜라겐 유도 관절염 동물 모델에 대한 동충하초 복합추출물의 치료 효과

오승준 · 이은정
대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Healing Effect of *Cordyceps Militaris* Extract Complex on Collagen II-Induced Arthritis Rats

Seung-Joon Oh, K.M.D., Eun-Jung Lee, K.M.D.
Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives This study was designed to evaluate the healing effect of *Cordyceps Militaris* (CM) on collagen II-induced arthritis rats.
Methods Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups (normal, control, positive control, CM with low/medium/high dosage each). Type II collagen mixed with complete Freund's adjuvant (with 1:1 v/v) was injected subcutaneously, and the mixture was injected in a same manner one week after the first injection to boost arthritis. Arthritis index, paw thickness and von Frey test were conducted to observe physical changes. hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to observe knee cartilage. The levels of messenger RNA (mRNA) expressions of interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in spleen were assessed by real-time polymerase chain reaction.
Results Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that occurs on multiple joints and can lead to temporary shape change of bones or organ failure in severe cases. Here, we aimed to determine the effect of CM extract on rheumatoid arthritis by measuring paw thickness, arthritis index, conducting von Frey test and H&E staining, and evaluating the level of IL-1β, IL-6, TNF-α. As a result, paw thickness, arthritis index significantly decreased in low concentration group, hind leg became less sensitive in all expermental groups. Also, histological analysis showed that the damage of knee cartilage was prevented in all experimental groups. The level of mRNA of IL-1β, IL-6, and TNF-α in spleen was analyzed to decide the effectiveness of CM extract. IL-1β did not show significant change, but IL-6 and TNF-α showed significant decrease in at least one of the experimental groups.
Conclusions CM showed protective effect on knee tissue destruction and improved the physical conditions of the leg involving arthritis. Also, it showed that CM has anti-inflammatory effect on specific cytokines inducing rheumatoid arthritis. In conclusion, this study demonstrated that the therapeutic potential of CM for the treatment rheumatoid arthritis, and set the foundation for the further studies. **(J Korean Med Rehabil 2022;32(3):1-11)**

Key words Rheumatoid arthritis, Cordyceps, Autoimmune diseases, Korean traditional medicine

RECEIVED June 20, 2022
REVISED June 29, 2022
ACCEPTED July 5, 2022

CORRESPONDING TO
Eun-Jung Lee, Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University, 75 Daedeok-daero, 176 beongil, Seo-gu, Daejeon 35235, Korea

TEL (042) 470-9128
FAX (042) 470-9005
E-mail jungkahn@hanmail.net

서론»»»

류마티스 관절염이란 염증성 관절염의 가장 흔한 형태 중 하나로 주로 가동관절의 활막에 호발하여 대칭적이고 다발적인 관절 손상을 유발하고 더 진행되면 관절의 손상에 이어 장기에도 영향을 끼치는 전신적이며 만성적인 자가면역질환이다[1].

류마티스 관절염의 표준치료제로 비스테로이드성 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)나 질병조절항류마티스제(disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 등을 사용하는데 이러한 약물들은 심혈관계 질환, 신장 손상 등의 부작용을 동반하기도 하고[2], 전체 환자의 약 50% 정도에서는 증상 개선이 미미하게 나타나는 등[3] 한계 역시 존재한다. 이와 같은 한계점에 대해 한의학과 한약제제는 류마티스 관절염의 치료에 있어 대안이 될 수 있으며, 실제로 국내・외에서 다양한 방법으로 한약제제를 류마티스 관절염의 치료에 적용한 연구를 많이 찾아볼 수 있다[4-6].

건강보험심사평가원의 '보건의료 빅데이터 개방시스템'에 따르면 류마티스 관절염 환자가 한방 치료를 받은 경우는 2015년 7,418명에서 2019년 8,549명으로 4년간 1,131명이 증가하였고, 전체 한방의료기관 내원 질환 중 11위에 해당하는 등 한방치료에 대한 수요가 꾸준히 늘어나고 있는 질환이지만[7] 류마티스 관절염의 치료에 대해 한의학계의 표준화된 치료법이나 규격화된 처방은 없는 실정이다.

류마티스 관절염의 한약치료에 대한 연구로는 가시오가피[8], 加味防己黃芪湯[9], 加味桂芍知母湯[10] 등의 유효성이 계속해서 보고되고 있으나 주로 탕제 위주로 이루어졌으며, 민간 약물에 대한 연구는 부족한 실정이다.

동충하초 복합추출물(*Cordyceps Militaris* complex extract, CM)은 동충하초, 저육, 매실진액으로 구성된 처방으로 대전대학교 한방병원 통증재활의학센터에서 DMARDs와 스테로이드를 복용하는 류마티스 관절염 환자에게 처방하여 관절통 및 부종이 감소되는 것을 관찰한 경험방이다.

冬蟲夏草는 甘溫하여 補虛益氣, 止咳化痰한 효과가 있는 것으로 알려져 있고[11] 주성분 중 하나인 cordycepin은 류마티스 관절염 활막의 섬유아세포에서 interleukin-1 beta (IL-1β)로 인한 matrix metalloprotenases (MMP)-1, MMP-3의 발현을 억제하고[12] 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 activated protein kinase, transforming growth factor-beta (TGF-β), nuclear factor kappa B (NF-κB)와 같은 다양한 염증성 경로를 조절하는 것[13]으로 보고되었다. 또한 梅實은 無毒, 酸澁하여 生津止渴, 解毒하는 효능이 있어 여러 연구에서 장염 동물 모델의 소화기능 개선[14], NF-κB 활성 억제를 통한 다양한 만성 염증성 질환 치료[15] 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다. 豬肉은 苦, 微寒한 약재로 滋陰潤燥 하는 효능이 있고, 해독 효과 또한 보고되었다[16].

이에 저자는 동충하초 복합추출물(CM)의 류마티스 관절염에 대한 치료 효과를 알아보고자 type II collagen으로 유도된 관절염 동물모델에 CM을 투여한 뒤 형태학적 분석, 조직학적 검사, 염증 cytokine 분석 등을 시행하여 류마티스 관절염의 개선 정도를 확인하여 의미 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 약재

동충하초(冬蟲夏草)는 대전대학교 부속 대전한방병원, 저육(豬肉)은 동양농장(Wanju, Korea), 매실(烏梅)진액(매실 60%, 갈색설탕 40%)은 하동사랑매실농장(Hadong, Korea)에서 구입하여 아래와 같이 각각 1:30:6의 비율로 혼합하였다(Table I).

2) 동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 6주령 수컷 Sprague-Dawley (SD) rat (190-220 g)를 분양

Table I. The Herbal Composition of *Cordyceps Militaris* Complex

Scientific name	Amount (g)
Cordyceps Militaris	1
Sus scrofa domesticus Brisson	30
Prunus mume Sieb. et Zucc.	6
Total amount	37

받아 1주일간 실험실 환경에 적응시키며 사육한 후 실험에 사용하였다. 사육환경의 온도는 23±1℃로 맞추었고 12시간 light-dark cycle의 환경에서 사육하였으며, 사육기간 고형사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호: DJUARB2020-018).

2. 방법

1) 약재 추출

5첩 분량의 한약재 185 g에 1 L의 증류수를 넣고 약탕기(Daewoong, Naju, Korea)를 이용하여 약 2시간 동안 열수 추출한 뒤 Whatman No. 2 filter (Maidstone, UK)로 여과해 용액에 추출된 성분만을 분리하였다. 여액은 rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 70℃에서 감압 증발한 뒤 동결건조하여 14.5 g의 건조분말(약 7.8%의 수율)을 얻었다. 분말은 -80℃에 분주하여 보관하였으며 사용하기 전 생리식염수로 희석하여 0.45 μm 필터로 거른 후 사용하였다.

2) 관절염 유발 및 확인

관절염 유발은 7주된 rat에 chick type II collagen을 0.1 M acetic acid에 2 mg/mL로 용해시킨 후 complete Freund’s adjuvant (CFA)와 1:1로 혼합하여 150 μL를 꼬리에 피하주사하고 7일 후 동일한 양의 혼합액을 꼬리에 한번 더 주사하여 관절염을 유도하였다. 관절염 유도 14일 후 3명의 연구자가 독립적으로 발적, 종창 등을 육안으로 확인하여 관절염 유발 여부를 결정하였다.

3) 군 분류 및 약물 투여

정상군 6마리를 제외한 30마리에 관절염을 유발하였으나 19마리에서만 관절염이 유발되어 정상군 6마리, 대조군 3마리, 양성 대조군과 실험군은 4마리씩 임의로 배속하고, 약물투여 후 24일에 관절염 유발을 확인한 후 치사하였다.

양성 대조군은 임상에서 관절염 치료제로 사용되는 methotrexate (MTX; 0.3 mg/kg; Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)을 100 μL씩 복강에 주사하였다. 대조군에는 생리식염수를 300 μL씩 경구 투여하였다. 실험군은 CM을 각기 다른 용량으로(25, 50, 100 mg/kg) 24일 동안 1일 1회 일정 시간에 경구 투여하였다.

24일간 투약을 지속한 뒤 아이프란액(isoflurane; Hana Pharm Co., Ltd., Seoul, Korea)으로 흡입마취하여 치사시킨 후 뒷다리 무릎관절과 비장 조직 시료를 얻어 실험에 사용하였다(Fig. 1).

4) Von Frey test

실험동물 뒷발의 외부자극에 대한 민감도를 측정하기 위해 von Frey test를 시행하였다. 가로×세로×높이가 30×10×10 cm인 상자의 바닥에 철망을 깔고 그 위에 랫트를 넣고 1시간동안 안정시켰다. 그 후에 25 g의 세기로 electronic von Frey aesthesiometer (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA)를 사용하여 랫트의 뒷발에 10회 자극을 준 뒤 뒷발을 들거나 긁는 행동을 취하는 횟수를 측정하였다.

5) Paw thickness 분석

실험동물 뒷발의 형태 변화와 부종 정도를 측정하기 위해 뒷발의 두께를 일주일에 3회씩 24일간 electronic digital calliper (Mitutoyo Co., Kanagawa, Japan)를 이용하여 측정하였다.

6) Arthritis index 분석

3명의 연구자가 독립적으로 랫트의 뒷발의 발적과 부종 정도를 육안 관찰하여 0~5점으로 배점한 뒤 평균을 내어 관절염 등급을 평가하였다(Table II).

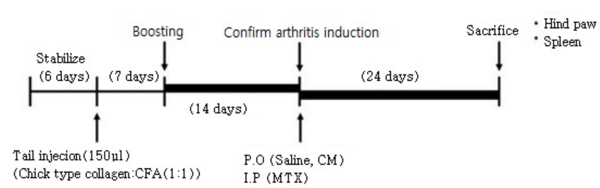

Fig. 1. Timeline of experiment. CFA: complete Freund’s adjuvant, P.O: per oral administration, CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, I.P: intraperitoneal, MTX: methotrexate.

Table II. Grade of Arthritis Index

Grade	Level of severity
0	No arthritis
1	Small degree of arthritis
2	Light swelling and redness
3	Medium swelling and redness
4	Severe swelling and redness
5	Severe swelling, redness and non-weight bearing

7) 염증 cytokine 분석

관절염에 의한 면역관련 cytokine을 검증하기 위하여 모든 실험 그룹에서 얻은 동물의 비장조직으로 real-time polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 우선 trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 비장조직에서 total RNA를 분리한 후 PrimeScript™ RT 시약 키트(TaKaRa, Shiga, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 각 messenger RNA (mRNA) 발현의 수준은 각 특정 primer를 이용하여 측정하였다. 사용된 primer는 다음과 같다: IL-1β의 정방향 primer 염기서열은 5'-CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG-3', 역방향 primer 염기서열은 5'-GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC-3'; interleukin-6 (IL-6)의 정방향 primer 염기서열은 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC T-3', 역방향 primer 염기서열은 5'-TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG-3'; tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)의 정방향 primer 염기서열은 5'-AAA TGG GCT CCC TCT ATC AGT T-3', 역방향 primer 염기서열은 5'-TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG A-3'이었다. 그리고 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenas (GAPDH)의 정방향 primer 염기서열은 5'-AGT TCA ACG GCA CAG TCA AG-3', 역방향 primer 염기서열은 5'-TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC-3'을 사용하였다. 상대 mRNA 수준은 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 함께 7500 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 정량화되었다. 상대 발현은 하우스 키핑 유전자 GAPDH에 대한 정규화를 포함하는 ΔΔCt (여기서 Ct는 임계값에서 사이클 수) 분석 방법을 사용하여 계산하였다. PCR 반응은 95°C (15 sec) 및 60°C (1 min)에서 40주기 동안 실행하였다.

8) 병리조직학적 검사

치사된 실험동물로부터 관절염을 유발한 뒷다리를 적출하고 무릎관절을 감싸고 있는 근육조직들을 제거한 뒤 조직을 10% formaldehyde에 1주일 동안 고정하였다. 고정된 조직은 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 파라핀 블록을 4 μm 두께로 박절하여 절편을 만들었다. 탈파라핀 후 함수, 수세 과정을 거쳐 hematoxylin 과정을 10분간 처리하고, 수세 후 eosin에 1분 40초간 처리하였다. 그 다음 함수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 bright field microscope (Nikon, Japan)로 관찰하였다.

3. 통계분석

실험 결과는 mean±standard error of the mean으로 기록하였으며, 통계처리는 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용하였고, Mann-Whitney test로 유의성을 검증하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»

1. Von Frey test 변화

실험동물의 뒷발 민감도의 변화를 확인하고자 von Frey test를 시행하였다. 정상군은 1.08±0.95회, 대조군은 6.63±1.87회의 자극반응을 나타냈다. MTX군은 3.4±1.36회, CM_L군은 3.13±1.17회, CM_M군은 3.5±1.12회, CM_H군은 2.5±1.12회의 자극반응을 보여 실험군의 모든 농도에서 통계적으로 유의한 민감도 감소를 보였다(Fig. 2).

2. Paw thickness 변화

실험동물의 뒷발 두께 변화를 알아보고자 2일 간격으로 뒷발의 두께를 electronic digital calliper를 이용하여 측정하였다. 정상군은 24일동안 뒷발 두께가 5.6±0.3 mm

에서 5.8±0.3 mm로, 대조군은 9.5±0.2 mm에서 9.6±1.4 mm로, MTX군은 9.5±1.1 mm에서 9.3±1.41 mm로 통계적으로 유의한 변화가 없었다. 그러나 CM_L군은 10.8±0.7 mm에서 8.5±0.25 mm로 뒷발의 두께가 유의하게 감소하였다. CM_M군은 9.5±0.9 mm에서 9.2±0.6 mm로, CM_H군은 9.2±1.1 mm에서 8.9±1.0 mm로 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3A).

관절염 유발 후 CM을 투여한 발 두께의 1일 차와 24일차의 상대적 변화를 백분율로 환산한 결과 정상군, 대조군, MTX군은 각각 103.41±5.39%, 101.10±16.13%, 99.73±18.90%로 변화가 거의 없었으나 CM_L군은 78.22± 3.15%로 나타나 통계적으로 유의한 두께의 감소를 보였다(Fig. 3B).

3. Arthritis index 변화

실험동물의 뒷발 부종 및 발적의 변화를 알아보고자 arthritis index를 평가하였다. 대조군에서는 4±0점에서 4±1점으로 큰 변화가 없었고 MTX군은 4±0.8점에서 3.6±1.3점으로 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. CM_M군은 3.8±1.0점에서 3.8±0.5점으로 변화가 없었고, CM_H군은 4.0±1.2점에서 3.6±1.1점으로 감소하였지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 CM_L군은 5.0±0점에서 3.0±0점으로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

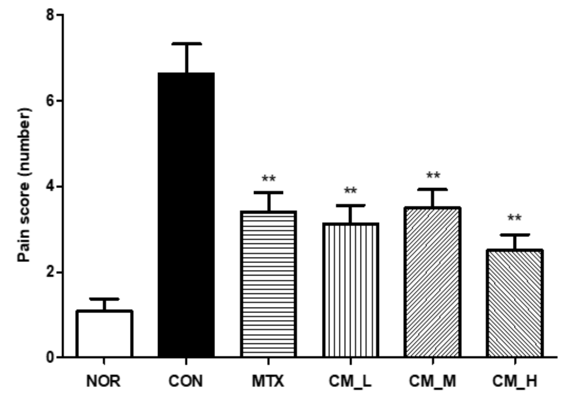

Fig. 2. Effect of CM on the pain sensitivity in collagen II-induced arthritis rats. The Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with type II collagen in the base of tail twice with 1-week interval. The animals were orally administrated with CM (25, 50 and 100 mg/kg) for 24 days. The pain sensitivity was analyzed by von Frey test with 25 g pressure for 10 times. CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, Nor: normal (non-treated rats), Con: control (arthritis group treated with vehicle), MTX: arthritis group treated with methotrexate (0.3 mg/kg/day), CM_L: arthritis group treated with CM (25 mg/kg/day), CM_M: arthritis group treated with CM (50 mg/kg/day), CM_H: arthritis group treated with CM (100 mg/kg/day). Significantly different from control (**p<0.01).

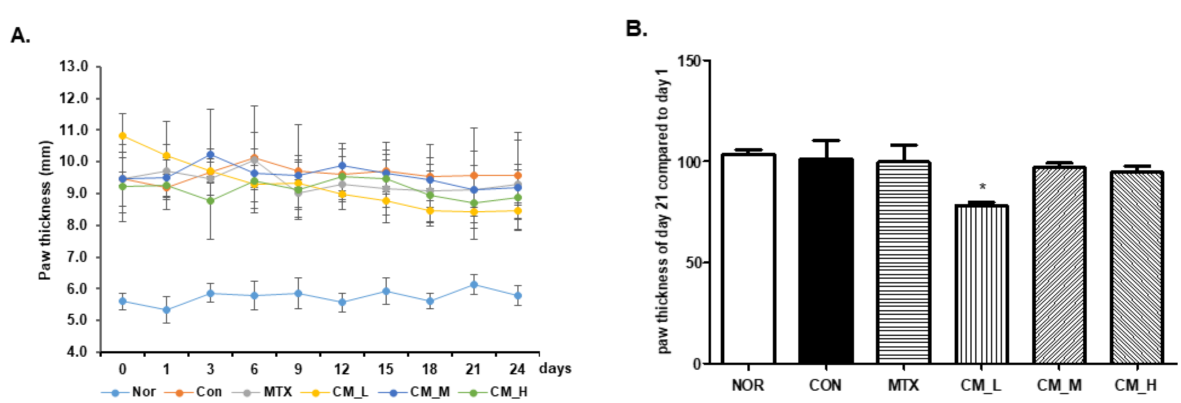

Fig. 3. Effect of CM on paw thickness in collagen II-induced arthritis rats. The Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with type II collagen in the base of tail twice with 1-week interval. The animals were orally administrated with CM (25, 50 and 100 mg/kg) for 24 days. The thickness of paw was measured every other day. (A) The paw thickness was measured 3 times in a week for 24 days using electronic digital caliper. (B) The relative paw thickness was calculated by comparing the thickness of the first day and that of last day in each group. CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, Nor: normal (non-treated rats), Con: control (arthritis group treated with vehicle), MTX: arthritis group treated with methotrexate (0.3 mg/kg/day), CM_L: arthritis group treated with CM (25 mg/kg/day), CM_M: arthritis group treated with CM (50 mg/kg/day), CM_H: arthritis group treated with CM (100 mg/kg/day). Significantly different from control (*p<0.05).

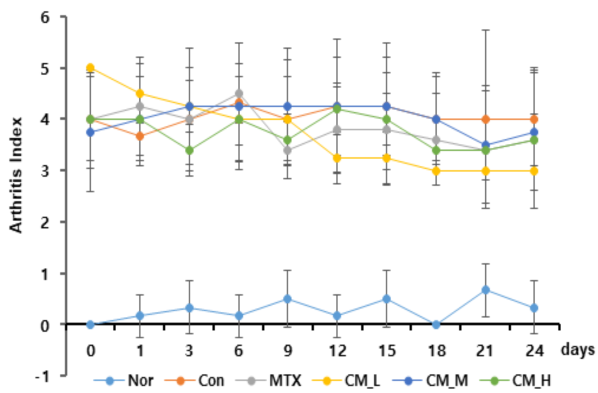

Fig. 4. Effect of CM on the arthritis index in collagen II-induced arthritis rats. The Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with type II collagen in the base of tail twice with 1-week interval. The animals were orally administrated with CM (25, 50 and 100 mg/kg) for 24 days. Arthritis index was scored every other day. CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, Nor: normal (non-treated rats), Con: control (arthritis group treated with vehicle), MTX: arthritis group treated with methotrexate (0.3 mg/kg/day), CM_L: arthritis group treated with CM (25 mg/kg/day), CM_M: arthritis group treated with CM (50 mg/kg/day), CM_H: arthritis group treated with CM (100 mg/kg/day).

4. 염증성 cytokine 생성 변화

1) IL-1β

관절염 유발 실험동물에서 염증성 사이토카인 IL-1β의 발현량 변화를 알아보았다. 그 결과 정상군은 1.72±0.51, 대조군이 2.59±0.38, MTX군이 1.80±0.55이었다. 실험군인 CM_L이 2.35±0.13, CM_M이 2.41±0.37, CM_H가 2.06±0.84로 나타나 적은 양이기는 하지만 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 5A).

2) IL-6

관절염 유발 실험동물에서 염증성 사이토카인 IL-6의 발현량 변화를 알아보았다. 그 결과 정상군은 0.91±0.13, 대조군이 1.17±0.33, MTX군이 0.99±0.49이었으며, 실험군인 CM_L이 0.99±0.46, CM_M이 0.60±0.23, CM_H가 1.14±0.34로 나타났다.

CM_L군에서는 대조군에 비하여 관절염 유발에 의한 IL-6의 mRNA 발현이 감소하여 정상군과 비슷하게 발현되었으나 통계적으로 유의하지는 않았고, CM_H군에서는 대조군과 비슷한 발현을 보였다. CM_M군에서는 IL-6 발현이 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타났다(Fig. 5B).

3) TNF-α

관절염 유발 실험동물에서 염증성 사이토카인 TNF-α의 발현량 변화를 알아보았다. 정상군은 1.05±0.14, 대조군이 1.61±0.30, MTX군이 0.78±0.42이었으며, 실험군인 CM_L이 0.80±0.35, CM_M이 0.56±0.33, CM_H가 0.56±0.35로 나타났다.

실험군 모두에서 대조군에 비하여 TNF-α의 mRNA의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 5C).

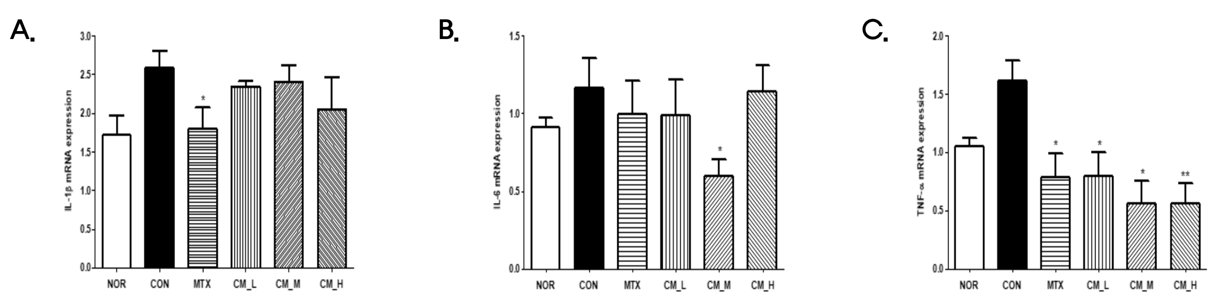

Fig. 5. Effect of CM on the mRNA level of IL-1β, IL-6, TNF-α in spleen from collagen II-induced arthritis rats. The Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with type II collagen in the base of tail twice with 1-week interval. The animals were orally administrated with CM (25, 50 and 100 mg/kg) for 24 days. Total RNAs were isolated from spleen and used for real-time PCR with rat IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) specific primers. CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, Nor: normal (non-treated rats), Con: control (arthritis group treated with vehicle), MTX: arthritis group treated with methotrexate (0.3 mg/kg/day), CM_L: arthritis group treated with CM (25 mg/kg/day), CM_M: arthritis group treated with CM (50 mg/kg/day), CM_H: arthritis group treated with CM (100 mg/kg/day). mRNA: messenger RNA, IL: interleukin, TNF-α: tumor necrosis factor-α. Significantly different from control (*p<0.05, **p<0.01).

5. 병리조직학적 변화

관절염 유발 실험동물의 무릎관절 손상 정도를 확인하기 위해 실험동물의 무릎관절 조직슬라이드를 제작하고 hematoxylin and eosin (H&E) staining을 시행하였다. 그 결과 대조군에서는 무릎관절의 연골과 활막이 파괴되고, 대퇴골과 경골의 미란이 관찰되는 등 관절의 파괴가 증가되는 것이 관찰되었고, MTX군과 실험군에서는 대조군에 비하여 관절염 유발에 의한 관절의 파괴가 감소된 것을 관찰하였다. 특히 실험군 모두에서 관절연골과 활액막의 파괴가 거의 진행되지 않았다(Fig. 6).

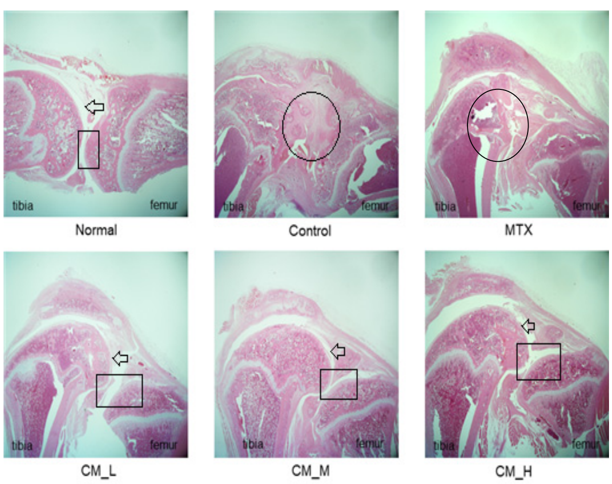

Fig. 6. Effect of CM on histological changes of knee joint in a collagen II-induced arthritis rats. The Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with type II collagen in the base of tail twice with 1-week interval. The animals were orally administrated with CM (25, 50 and 100 mg/kg) for 24 days. Hematoxylin and eosin staining of knee tissue was conducted. CM: *Cordyceps Militaris* complex extract, MTX: arthritis group treated with methotrexate (0.3 mg/kg/day), CM_L: arthritis group treated with CM (25 mg/kg/day), CM_M: arthritis group treated with CM (50 mg/kg/day), CM_H: arthritis group treated with CM (100 mg/kg/day). ⇨: synovial membrane, □: cartilage, ○: destroyed knee joint (magnification, ×40).

고찰»»»

류마티스 관절염은 염증성 사이토카인을 매개로 전신 가동관절의 염증반응을 주 증상으로 하는 자가면역 질환이다[17]. 특정 항원 또는 자가면역반응 등으로 발생된 신호가[18] 염증 매개물질인 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 물질들에 의해 증폭되며 이로 인한 관절의 통증, 염증, 부종과 손상에 의한 변형 등을 초래한다. 류마티스 관절염은 크게 두 단계로 나누어 진행되는데, 초기에는 관절 구성성분에 대한 자가면역반응을 통해 T세포가 Th1 세포로 분화하고, 이 Th1세포가 IL-1β, TNF-α와 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 자가면역반응이 진행된다[19]. 이후 관절 내 활액 세포가 MMPs, 사이토카인 등을 생산하여 관절 및 골조직의 파괴가 진행된다[20]. 결과적으로 류마티스 관절염이 진행 중인 활막은 활성화된 림프구, 대식세포 등의 면역세포가 생산하는 IL-6, IL-1β, TNF-α, TGF-β, IL-8 등의 다양한 사이토카인들이 존재하게 되며 이들 사이토카인이 류마티스 관절염의 병리적, 임상적 증상의 원인으로 생각된다[21]. 따라서 류마티스 관절염의 치료제는 면역체계의 조절 능력과 염증매개물질에 대한 억제 효과를 나타내야 한다.

류마티스 관절염의 치료에는 DMARDs, NSAIDs와 같은 약물들이 질병의 정도에 따라 사용되지만, NSAIDs는 염증 이전단계의 프로스타글란딘을 억제하여 통증, 부종 등 증상 치료에는 효과적이나 질환 자체의 경과나 관절 파괴를 억제하지는 못한다. DMARDs는 질환의 경과를 늦추거나 파괴가 일어나기 이전의 활막에 대한 보호 효과는 있지만 이미 파괴된 무릎관절을 치유하거나 관절 변형을 되돌리지는 못하는 한계가 있다[22]. 또한 이러한 약물들의 장기적인 사용은 면역체계 교란, 소화불량, 심장질환, 신기능 장애 등의 다양한 부작용을 동반하기도 하며 전체 환자의 절반 정도에서는 치료 효과를 보이지 않기도 한다[3].

한의학에서는 류마티스 관절염을 歷節風, 痺證[23] 등으로 보아 그 원인에 따라 行痺(風), 痛痺(寒), 着痺(濕), 熱痺, 瘀血痺 등으로 구분하여 치료하며[24] 체계적 문헌 고찰을 통해 한약제제 투여가 류마티스 관절염 치료에 효과적임을 밝힌 바 있다[25].

동충하초(*Cordyceps Militaris*)는 그 성질이 甘溫하여

補益精氣, 止咳化痰하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔다. 최근에는 면역체계 조절 작용에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 면역억제 쥐에서 항산화 작용을 강화하여 면역작용을 활성화하거나[26] 단백질 합성을 억제하고, 세포자살을 유도하여 항암효과를 나타내는 것으로 보고되었다[27,28].

CM은 동충하초, 저육, 매실로 구성된 처방으로 Ahn 등[29]은 동충하초 추출물이 Th1 세포와 Th2 세포의 기능을 조절하여 IL-6과 interferon-γ의 분비를 촉진시키는 등 생쥐의 면역기능을 향상시킴을 보고한 바 있다. 매실 추출물 또한 NF-κB 활성 조절을 통한 항염증효과를[15], 저육의 열수추출물은 mouse의 비장세포 증식 촉진, Th1 세포의 사이토카인 분비 촉진 등의 작용을 통해 면역기능을 강화시키는 효능이 보고되었다[30]. 하지만 이러한 연구들은 실험동물의 외부 항원에 대한 면역반응을 향상시키는 것에 집중하여 자가면역성 질환에 대한 면역반응 조절 효과는 확인할 수 없다는 한계가 있었다. 이에 저자는 동충하초 복합추출물이 type II collagen 유발 생쥐의 관절염에 나타내는 치료 효과를 확인하고자 하였다.

6주령 수컷 SD rats를 1주일간 사육한 뒤 chick type II collagen과 CFA를 꼬리에 피하주사하고 1주 후 동량을 꼬리에 재차 주사하여 관절염을 유도하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 양성대조군, 실험군 저농도군, 실험군 중간농도군, 실험군 고농도군의 총 6개의 실험군으로 나누고, 24일간 약물 투여를 진행한 뒤 치사하였다.

CM의 효과를 확인하기 위해 실험동물 치사 전 뒷발 두께의 물리적인 변화를 확인하기 위해 paw thickness를, 관절염 유발 다리의 발적, 부종 정도의 변화를 확인하여 arthritis index를 측정하고, 관절염 유발 다리의 민감도 변화와 통증 양상을 확인하기 위해 von Frey test를 시행하였다. Paw thickness와 arthritis index는 CM_H, CM_M군에서는 통계적으로 유의한 치료효과를 보이지 않았으나, CM_L군에서는 다른 실험군이나 양성대조군에 비해 통계적으로 유의한 치료효과를 보였다. Von Frey test 결과 MTX군과 실험군 모두에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 민감도의 감소를 나타내었다.

관절염 유발 조직의 손상 정도를 확인하기 위하여 실험동물의 무릎관절 조직을 슬라이드로 만든 뒤 H&E 염색을 하고 현미경으로 관찰하였다. 실험군의 경우 무릎관절 조직이 정상군과 큰 차이를 보이지 않을 정도로 손상 정도가 경미하였다.

실험결과를 종합해보면 CM은 육안으로 보이는 뒷다리의 두께나 관절염 지표, 무릎관절 조직의 보호, 쥐가 주관적으로 느끼는 민감도에 대해 유의한 치료 효과를 나타내었다. 특히 무릎관절의 활막 손상과 골파괴의 진행을 유의하게 늦추었다.

류마티스 관절염을 유발한 실험동물의 면역매개물질의 발현 정도를 알아보기 위해 비장조직에서 RNA를 추출하여 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현량을 각각 측정하였다. IL-1β의 발현량은 MTX군에서만 유의하게 감소하였고, 세 실험군에서는 대조군에 비하여 줄어들기는 했지만 통계적으로 유의하지는 않았다. IL-6의 발현량은 대조군과 비교했을 때 CM_M군에서만 통계적으로 유의한 감소를 보였고 MTX군, CM_L군에서는 유의하지 않은 감소를, CM_H군에서는 차이 없음을 보였다. TNF-α의 발현량은 MTX군과 모든 실험군에서 통계적으로 유의하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다.

TNF-α는 염증을 통한 생체방어기전에 관여하는 사이토카인으로 주로 대식세포에서 생성되며, 이외에도 호중구, 림프구, NK 세포 등에서 유래한다. 주된 기능으로는 항종양 활성, 분화 증식의 조절, 염증반응 촉진 등이 알려져 있다[31]. IL-1β의 주요 기능은 TNF-α와 유사하며 감염이나 자극 등에 대한 염증반응의 매개체 역할을 한다. T세포, B세포, 비만세포, 호중구 등에 다양하게 작용하며, 염증반응을 통한 면역 활성이 주목적이다[32]. IL-6은 선천성 면역과 후천성 면역 모두에서 기능을 하며, 급성기 염증반응과 선천성 면역반응 모두에서 작용을 한다[33]. Mateen 등은 관절염의 염증반응에서 가장 주된 작용을 하는 사이토카인은 TNF-α이며 증가된 TNF-α 농도는 관절조직의 파괴와 염증반응의 증가를 초래한다고 보고하였다[34]. IL-1β는 다양한 류마티스 관절염 환자에서 증가하는 것으로 보고된 바 있고, TNF-α가 주로 관절조직의 파괴 등에 관여하는 반면 IL-1β는 조조강직 등의 증상과 연관성이 높은 것으로 알려져 있다[35]. IL-6 또한 류마티스 관절염 환자의 혈장에서 높은 농도를 유지하는 것으로 알려져 있고, 호중구 등에 작용하여 TNF-α와 유사하게 염증반응과 관절조직의 손상을 유발한다[36]. 또한 동충하초의 핵심 성분인 cordycepin은 류마티스 관절염 활막 섬유아세포에서 IL-1β로 인해 유발된 MMP-1과 MMP-3로 인한 자가면역기전을 억제하여 치료 효과

를 나타내는 것으로 알려진 바 있다[12]. CM이 IL-1β의 발현에 효과를 나타내지 못한 이유는 동충하초 추출물이 면역과정 중 IL-1β 자체에 작용하기보다는 IL-1β가 유발하는 이차성 사이토카인에 작용하기 때문으로 생각된다.

이에 비추어 보아 CM은 관절 조직의 손상을 방지하고, 염증반응을 억제하는 등 류마티스 관절염의 여러 증상 중 물리적 변형, 조직의 파괴와 과도한 염증반응 등에는 유의한 효과가 있는 것으로 보이지만, 그 외 다른 계통의 증상과 다른 면역기전에 대해서는 그 효과에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 면역과정에서 발현되는 사이토카인들과 면역 매개물질들의 다양화를 통해 구체적인 작용기전과 작용 시점을 알아내는 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 류마티스 관절염에 대한 CM의 임상적 효과를 확인하기 위해 동물 실험을 시행하였다. 실험 결과 관절염 유발 동물 모델에서 뒷다리 민감도의 감소, 두께 감소, 조직 손상의 억제 등의 효과가 나타났으며, 이를 형태학적, 조직학적 검사 및 유전자 검사로 확인할 수 있었다. 이러한 점에 비추어 보아 본 연구는 기존의 冬蟲夏草 추출물 관련 연구들이 세포 단위의 실험을 시행하거나[12] 항염증 과정에서 염증성 사이토카인의 발현량 변화만을 관찰한 것[13]에 비해 조금 더 복합적인 관찰을 시행하였다는 차이점이 있다.

이는 실험적으로 CM의 류마티스 관절염에 대한 치료 효과를 규명한 것으로 염증반응 억제, 조직 손상 방지 등의 측면에서 유의한 효과를 관찰할 수 있었다. 향후 다른 염증매개물질들의 작용기전에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 임상적으로 류마티스 관절염의 치료에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

결론»»»

동충하초 복합추출물(CM)이 type II collagen 유도 관절염 동물모델에 미치는 치료 효과를 평가하기 위하여 다리 민감도 측정, 다리 두께 및 관절염 지수 평가, 염증반응 관련 유전인자의 측정, 관절염 조직의 형태학적 관찰을 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다:

1. Paw thickness는 CM_L군에서 유의하게 감소하였다.
2. Arthritis index는 CM_L군에서 유의하게 감소하였다.
3. Von Frey test에서 모든 실험군에서 다리의 민감도가 유의하게 감소하였다.
4. 조직검사 결과 모든 실험군에서 관절 보호 효과를 나타내었다.
5. IL-1β mRNA 발현량은 실험군 모두에서 유의한 감소 효과가 나타나지 않았다.
6. IL-6 mRNA 발현량은 CM_M군에서 유의하게 감소하였다.
7. TNF-α mRNA 발현량은 모든 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 특히 CM_M군과 CM_H군에서 더욱 현저하게 감소하였다.

이상과 같이 CM은 류마티스 관절염의 진행과 관련된 면역매개물질들의 발현을 억제시키고, 조직의 파괴를 막아주며 염증반응을 감소시킨다. 이에 향후 류마티스 관절염의 치료제 개발에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

References»»»

1. The Korean Orthiopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:Choisin Medical Publishing Co. 2013.
2. Obiri DD, Osafo N, Ayande PG, Antwi AO. Xylopia aethiopica (Annonaceae) fruit extract suppresses Freund's adjuvant-induced arthritis in Sprague-Dawley rats. J Ethnopharmacol. 2014;152(3):522-31.
3. Yoo DH. Recent trend in the treatment of rheumatoid arthritis. Journal of the Korean Orthopaedic Association. 2010;45(6):419-25.
4. Manheimer E, Wieland S, Kimbrough E, Cheng K, Berman BM. Evidence from the cochrane collaboration for traditional Chinese medicine therapies. J Altern Complement Med. 2009;15(9):1001-14.
5. Hunt KJ, Coelho HF, Wider B, Perry R, Hung SK, Terry R, Ernst E. Complementary and alternative medicine use in England: results from a national survey. Int J Clin Pract. 2010;64(11):1496-502.
6. Goldrosen MH, Straus SE. Complementary and alternative medicine: assessing the evidence for immunological benefits. J Nat Rev Immunol. 2004;4(11):912-21.

7. Healthcare Bigdata Hub. Yearly patients record [Internet] 2020 [cited 2020 May 9]. Available from: URL: http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfrnIntrsIlnsInfo.do.
8. Kim KY, Sim KC, Kim GY, Choi CH, Jung JG, Chung JS, Jeong HW. Effects of acanthopanax senticosus and onion mixture extract on the collagen-induced arthritis in rat model. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2011;25(6):1000-7.
9. Sim BY, Choi HJ. Effects of GamiBangkeehwangkee-tang ethanol extract on collagen-induced rheumatoid arthritis model of DBA/1 mice. The Korea Journal of Herbology. 2014;29:95-102.
10. Sim BY. Effect of Gamikyejakjimo-tang ethanol extract on rheumatoid arthritis factors. The Korea Journal of Herbology. 2014;29(5):65-73.
11. The Compilation Committee of Korean Medicine dictionary. The Korean medicine dictionary. 2nd ed. Seoul:Jeongdam. 2010.
12. Noh EM, Kim JS, Hur H, Park BH, Song EK, Han MK, Kwon KB, Yoo WH, Shim IK, Lee SJ, Youn HJ, Lee YR. Cordycepin inhibits IL-1beta-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Rheumatology (Oxford). 2009;48(1):45-8.
13. Tan L, Song X, Ren Y, Wang M, Guo C, Guo D, Gu Y, Li Y, Cao Z, Deng Y. Anti-inflammatory effects of cordycepin: a review. Phytother Res. 2020;35(3):1284-97.
14. Lee SY, Lee SJ, Hur SJ. Effects of Prunus mume Sieb. et Zucc. extract and its biopolymer encapsulation on a mouse model of colitis. J Sci Food Agric. 2017;97(2):686-92.
15. Lee HL, Park YS, Kim HJ, Lee AR, Choi JH, Pyee JH, Park HY, Kim JM. Extract from Prunus mume Sieb. et Zucc. fruit prevents LPS-induced homotypic aggregation of monocytic THP-1 cells via suppression of nitric oxide production and NF-κB activation. J of Life Science. 2015;25(7):801-9.
16. Rho JH, Han CK. Effects of pork on feeding on detoxification process in rats intoxicated with lead. J Anim Sci & Technol. 2007;49(3):415-28.
17. Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. N Engl J Med. 1990;322(18):1277-89.
18. Kwon YJ, Shung SJ, Kim TY, Park MC. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist inhibits pro-inflammatory gene expressions and cellular proliferation of fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis by down-regulation of NF-kappaB. J Korean Rheum Assoc. 2010;17(2):153-61.
19. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. Life Sci. 1997;61(19):1861-78.
20. Sylvester J, Liacini A, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Tripterygium wilfordii Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor-kappaB activities. Mol Pharmacol. 2001;59:1196-205.
21. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumornecrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1995;38:151-60.
22. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2012;376(9746):1094-108.
23. Choi DY, Lee JD, Back YH, Lee SS, Yoo MC, Han CS, Yang HI, Park SD, Ryu MH, Park EK, Park DS. Recent trends of immunologic studies of herbal medicine on rheumatoid arthritis. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2004;21(4):177-96.
24. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 5th ed. Paju:Koonja Publishing. 2020:104-6.
25. Won JY, Jeon CH, Song HJ, Jeong JW, Kim TK, Kim HH, Leem JT. The effect of orally administered herbal medicines in collagen, LPS, CFA induced rheumatoid like arthritis animal model: a systematic review of animal study articles published in Korea after 2008. J Korean Med Rehabil. 2007;27(4):33-53.
26. Lee HH, Lee S, Lee K, Shin YS, Kang H, Cho H. Anti-cancer effect of *Cordyceps Militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis. Daru. 2015;23(1):35.
27. Wang M, Meng XY, Yang RL, Qin T, Wang XY, Zhang KY, Fei CZ, Li Y, Hu Yl, Xue FQ. *Cordyceps Militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice. Carbohydr Polym. 2012;89(2):461-6.
28. Rao YK, Fang SH, Wu WS, Tzeng YM. Constituents isolated from *Cordyceps Militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. J Ethnopharmacol. 2010;131(2):363-7.
29. Ahn TW, Lim SR, Wang SK. Effect of Kimchi containing Cordceps sinesis extract on the immune function of Babl/c mice. Kor J Oriental Preventive Medicine Society. 2002;6(2):156-67.
30. Kim HJ, Kim D, Lee M, Jang A. Anti-inflammatory effect of dietary pork extract on proliferation and cytokine secretion using mouse primary splenocytes. Food Res Int. 2017;102:710-6.
31. Andrews JS, Berger AE, Ware CF. Charaterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) on human T lymphocytes. TNF and LT differ in their receptor binding properties and the induction of MHC class I proteins on a human CD4+ T

cell hybridoma. J Immunol. 1990;144:2582-91.
32. Freidin M, Bennett MV, Kessler JA. Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin-1 beta. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:10440-3.
33. Berek JS, Chung C, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. Am J Obstet Gynecol. 1991;164:1038-42.
34. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta. 2016;455:161-71.
35. McInnes I, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nature Reviews Immunol. 2007;7:429-42.
36. Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. Rheumatology. 2010;49:15-24.