

澤蘭藥鍼이 Collagen으로 誘發시킨 關節炎에 미치는 影響

李俊昊* · 李秉烈*

ABSTRACT

A Study on the Effect of Aqua-acupuncture utilizing Lycopi Herba solution on Collagen II-induced Arthritis

Jun-ho, Lee* · Byung-Ryul, Lee*

* Dept. of Oriental Medicine Graduate school , Taejon University
Directed by Prof. Lee Byung-ryul, O.M.D., ph.D.

The purpose of this study is to observe the effect of Aqua-acupuncture utilizing Lycopi Herba Solution(LH-AS) on arthritis. For that purpose, we formed three experimental group, synovial cells of human body , normal BALB/C mice and DBA/1J mice with collagen II-induced arthritis, and measured the treatment effect of LH-AS on each group.

The conclusions are as follows.

1. After the LH-AS treatment on synovial cells, there were no significant change in 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ whereas there was significant change in 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in cytotoxicity.
2. IL-6, IL-1 β , TNF- α gene expression of synovial cells and the secretion amount of IL-6 and IL-1 β are significantly inhibited in treatment group with LH-AS.
3. The proliferation of synovial cells was significantly inhibited in treatment group with rIL-6, LH-AS 200 and rIL-6, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. After the DBA/1J mice with collagen II-induced arthritis were treated by LH-AS, the incidence of arthritis, hind paw edema, the index of arthritis and DTH were significantly inhibited.

Key Word : Aqua-acupuncture utilizing Lycopi Herba solution Arthritis

*大田大學校 韓醫科大學 鍼灸學教室

5. After the DBA/1J mice with collagen II-induced arthritis were treated by LH-AS, splenic weight was significantly increased and the number of leukocyte was significantly decreased. But there was no significant change in the number of platelet.

6. After the DBA/1J mice with collagen II-induced arthritis were treated by LH-AS, the number of CD4⁺, CD8⁺ activated cells and the surface-receptor expression were significantly increased whereas the number of CD19⁺ activated cells and the surface-receptor expression were decreased.

7. After the DBA/1J mice with collagen II-induced arthritis were treated by LH-AS, total protein, LDH were significantly decreased, but there was no significant change in creatinine.

8. After the normal splenic cells of BALB/C mice were treated by LH-AS and cultured, it was observed that the adherent cells were morphologically activated and IL-12 and IFN- γ gene expression were increased.

9. After the normal splenic cells of BALB/C mice were treated by LH-AS and cultured, the number of CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ activated cells and surface-receptor expression were inhibited when being compared with the control group.

Taking all these observations into account, LH-AS injection is considered to be effective in treating arthritis and put to practical use in future arthritis clinic.

I. 緒 論

關節炎은 關節部位에 發生하는 炎症疾患으로, 臨床的으로 風濕性關節炎(rheumatic athritis), 類風濕性關節炎(rheumatoid athritis) 및 骨關節炎(osteoathritis) 등으로 區分되며¹⁾, 그 症狀으로는 肢體關節에 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着, 活動障礙 등이 主된 것이다²⁾.

류마티오이드 關節炎은 주로 風, 寒, 濕, 熱邪의 原因으로 發生되며 諸症候群 중 痺, 痛風, 歷節風, 白虎風, 鶴膝風, 疔痺, 風痺 등의 範圍에 속한 다³⁾고 볼 수 있다.

治療는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 方法^{3,4)}으로 鍼과 藥物 등을 利用하는데, 鍼治療에 多用되는 經穴은 足三里⁵⁻¹¹⁾를 비롯하여 環跳, 合谷, 膝關, 委中, 肩髃, 絕骨, 天井 등⁵⁾의 穴이 있는데, 그 중 足三里(S36)¹²⁻¹⁵⁾는 膝關節痛, 下肢麻痺, 下肢風濕痛, 調

氣血, 強壯, 理脾胃, 浮腫 등의 疾患에 廣範圍하게 應用되어 왔으며, 實驗的으로 關節炎에 效果^{6-8,16,17)}가 認定되었다.

澤蘭은 性¹⁸⁻²¹⁾이 微溫無毒하고, 味¹⁸⁻²³⁾는 苦辛甘하며, 肝·脾經에 入^{18,20)}하고, 效能¹⁸⁻²³⁾은 活血祛瘀, 行水消腫하여, 利關節, 養血氣, 長肌肉, 骨節中水, 血瘀水腫, 身面四肢浮腫, 金瘡癰腫瘡膿, 破宿血, 消癥瘕 등에 活用하는데, 臨床的으로 澤蘭이 包含된 清熱利水湯이 류마티오이드 關節炎²⁴⁾에, 絲瓜絡, 五靈脂, 玄胡索을 配伍하여 慢性風濕性關節炎²⁵⁾에, 外用하여 關節擦傷後腫痛²⁵⁾에 使用되고 있다.

關節炎에 대한 藥鍼의 實驗的 研究로는 秦艽²⁶⁾, 薏苡仁¹⁶⁾, 斑貓¹⁷⁾, 草龍膽²⁷⁾, 草烏²⁸⁾, 加味疎風活血湯藥鍼²⁹⁾ 등이 Adjuvant 關節炎에 有效함을 報告하였고, 藥物의 經口投與 方法을 통해 大羌活湯³⁰⁾, 桂枝芍藥知母湯³¹⁾, 骨擔草³²⁾, 秦艽³³⁾ 등이 第II型 Collagen 誘發 關節炎에 有效하다고

報告하였다.

이에 著者は 足三里(S36)에 澤蘭藥鍼하여 關節炎 治療에 미치는 影響을 實驗的으로 究明하고자 人體 滑膜細胞를 分離하여 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 遺傳子 發現을 觀察하였고, 滑膜細胞 增殖 및 細胞毒性을 測定하였다. Collagen으로 誘發시킨 關節炎(CIA) DBA/1J 생쥐에서 關節炎의 發病率 및 關節炎 指標, 뒷다리 浮腫, 遲延型 過敏反應, 脾臟 무게, 白血球와 血小板數, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數, total protein, creatinine, LDH의 變化를 觀察하였고, 正常 BALB/C 생쥐에서 脾臟細胞를 分離하여 IL-12, IFN- γ 遺傳子 發現을 分析하였으며, 細胞培養을 통하여 免疫細胞인 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數의 變化를 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

實驗動物은 韓國化學研究所에서 購入한 BALB/c 4週齡 수컷 생쥐와 Charles River(Japan)로 부터 DBA/1J 6週齡 생쥐를 分讓 받아 實驗에 앞서 2週間 實驗室 環境에 適應시킨 후 使用하였다. 動物 飼育室의 條件은 conventional system으로 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 1日 중 12時間은 200~300lux로 照明하였고, 12時間은 모든 빛을 遮斷하였다. 飼料는 固形飼料(燥蛋白質 22.1%, 燥脂肪 8.0%, 燥纖維 5.0%, 燥灰分 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4% 包含, 三養社, 抗生劑 無添加)를 주었고, 물은 充分히 供給하였다.

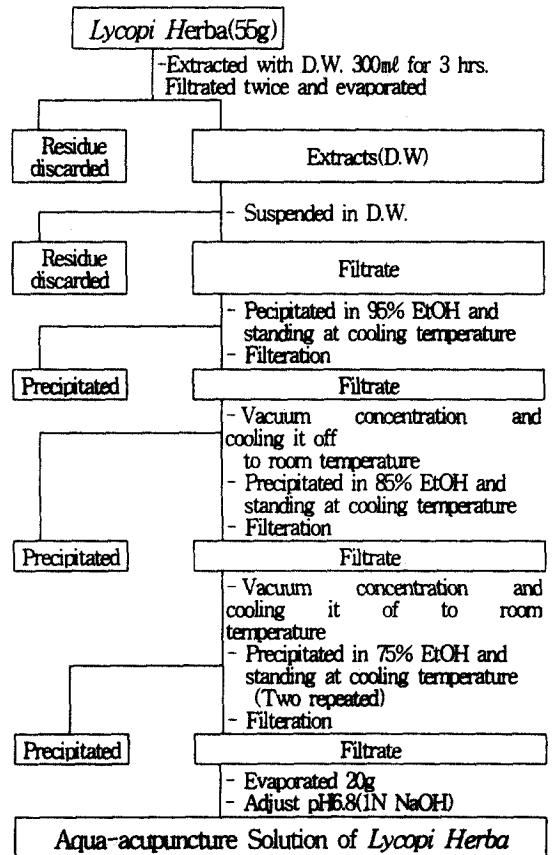
2) 藥材

實驗에 使用된 澤蘭(Lycopi Herba)¹⁸⁾은 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

3) 藥鍼液의 製造

澤蘭 55g을 粗末로하여 圓形 flask에 넣고 蒸溜水 300ml에 各各 加하여 3時間 동안 混合恒溫

水槽에서 流出하고 濾過한 다음, 이 沈澱物을 3回 濾別(3M paper)한 후 減壓濃縮器로 減壓濃縮 하였다. 澤蘭 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30ml를 加하여 室溫에서 攪拌한 후 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 濾液을 다시 減壓濃縮器로 減壓濃縮하여 生成된 沈澱物을 濾別한다. 濾液을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 攪拌하고 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고 다시 濾液을 75% ethyl alcohol 30ml를 加한 후 같은 操作을 2回 反復한 다음 濾液中 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣 全量을 20g이 되게 하였다. 1N NaOH로 pH 6.8로 調節하여 低溫에서 12時間 放置한 후 微量의 浮遊液을 濾別한 다음 高壓滅菌하여 藥鍼液을 製造한 후 使用時에는 10%로 稀釋하여 藥鍼하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Manufacturing Procedure of Aqua-acupuncture Solution of Lycopi Herba

microfiber filter, Whatman) 위에 捕獲하고, 乾燥한 후 放射線 測定器(Liquid scintillation counter, LKB)를 利用하여 放射線 同位 元素의 量을 測定하였다.

(3) 滑膜細胞의 逆傳寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)⁴¹⁻⁴⁴⁾

① RNA 抽出

培養終了 후 上層液을 除去한 후 RNAzol^B를 利用하여 滑液細胞膜을 터트린 후 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

② RT-PCR

逆轉寫(reverse transcription) 反應은 準備된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5分 동안 變性(denaturation)시키고, 여기에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 加한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 加하고, DEPC 處理된 蒸溜水로서 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 遠心沈降하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化 시킨 후 合成이 完了된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 使用하였다.

③ PCR

PCR은 恒溫水槽 方式의 Turbo ThermalcyclerTM(Bioneer Co., Korea)을 利用하여 遂行하였다. 反應은 이미 合成된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 使用하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-12(p35, IL-12), 그리고 interferon- γ (IFN- γ)를 增幅하기 위하여 sense

primer(20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 混合하여 1 μ l를 加하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase(5U/ μ l)를 添加한 다음 最終 부피가 30 μ l 되도록 滅菌蒸溜水를 加하고 predenaturation: 95 $^{\circ}$ C, 5分, denaturation: 95 $^{\circ}$ C, annealing: 55 $^{\circ}$ C, 1分, elongation: 72 $^{\circ}$ C, 1分을 25cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3分 동안의 條件으로 PCR을 遂行하였다. 各 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading 하여 120V 條件에서 20分間 電氣泳動을 통하여 分析하였다.

Oligonucleotide의 鹽基配列은 다음과 같다.

β -actin은, sense oligonucleotide, 5'- TGGATCCTCTGTGGCATC CATGAAAC-3'; antisense oligonucleotide 5'-TAAAACGCAGCTC AGT AACAGTCCG-3'

IL-6는, sense oligonucleotide, 5'-ATGAACT CCTTCTCCACAAG CGC-3'; antisense oligonucleotide 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTG GACTG -3'

IL-1 β 는, sense oligonucleotide, 5'-CCTCTT CTTGAGCTTGCAAC-3'; antisense oligonucleotide 5'-AGCCCATGAGTTCCATTTCAC-3'

TNF- α 는, sense oligonucleotide, 5'-AGCG GCTGACTGAAC TCAGATTGTTAG-3'; antisense oligonucleotide 5'-GTCACAGTT TTCAG CTGTATAGGG-3'

PCR product의 量은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 利用하여 最高값(height, Ht)으로 測定하였다.

(4) 滑膜細胞의 細胞毒性(Synovial Cell Cytotoxicity)^{45,46)}

細胞毒性 檢査方法은 SRB assay法⁴⁷⁾을 약간 變形하여 實驗에 使用했다. 滑膜細胞는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養基에서 자란 것을 Trysin-EDTA 溶液으로 單一細胞가 되도록 떼어내고, 細胞를 1.5 \times 10⁴ 個의 細胞를 96 well plate에 分株하고 培養

基(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 培養한 후 澤蘭藥 鍼液 濃度를 各各 400, 200, 100, 50, 10 및 1 μ g/ml 씩 48시간 處理하였다. 培養終了 후에 培養液 을 버리고 PBS로 2回 洗滌하였다. 各 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50 μ l를 加하고 1時間 동안 4°C에 放置하고, 蒸溜水로 5回 洗滌 한 다음 well plate를 空氣 中에서 乾燥하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 溶液을 100 μ l/well에 加하여 室溫에서 30分間 染色하였다. 그리고 0.1% acetic acid solution으로 約 4-5回 洗滌한 다음, 空氣 中에서 乾燥하고 10 mM Tris Base 로 100 μ l/well로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 흔들어 5分間 混合하고, ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540nm에서 吸光度를 測定하였다.

(5) 滑膜細胞의 增殖抑制^{48,49)}

rIL-6(R&D system) 등을 處理한 滑膜細胞의 增殖抑制程度를 測定하기 위하여 96 well plate의 各 well에 2 \times 10⁶ cells씩 添加하였고, 澤蘭藥 鍼液 을 各各 200, 100, 10 및 1 μ g/ml와 rIL-6(100U/ml)을 濃度別로 處理한 후 細胞를 37°C에서 48時間 培養 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] thymidine(Amersham, USA)을 添加한 후 다시 8時間 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線 同位元素의 量을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集器를 使用하여 琉璃纖維濾紙 위에 捕獲하고, 乾燥한 후 放射線 測程器를 利用하여 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

2) Collagen으로 誘發시킨 생쥐의 關節炎에 미치는 效果⁵⁰⁻⁵⁵⁾

(1) Collagen II(CII) 接種과 澤蘭 藥 鍼⁵⁶⁻⁵⁸⁾

CII를 0.05N acetic acid로 稀釋 液體가 될 때 까지 녹여 2mg/ml를 만들고 Freund's complete adjuvant와 同量으로 混合하여 2ml를 만들어 이 溶液에 녹아 있는 CII의 用量을 1mg/ml로 만들었다.

DBA/1J 생쥐 5 마리씩을 한 群으로 하여 對

照群, CTX處理群(陽性對照群) 및 澤蘭藥 鍼群의 3個 群으로 나눈 후 各 群에 CII를 1次(0日)와 2次(21日)에 걸쳐 各各 0.1ml(CII 100 μ g)를 꼬리 基部에 接種하였다.

對照群에는 CII 接種 以外의 處置를 하지 않았으며, CTX處理群에는 CTX(10mg/kg)를 CII 1次(0日)와 2次(21日) 接種할 때 2回 注射하였고, 澤蘭藥 鍼群은 CII 1次 接種日부터 1日 1回, 總 48回 藥 鍼하였다.

(2) 取 穴

생쥐의 體表上의 털을 除去한 후 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 使用하여 人體의 足三里(S36)에 相應하는 部位에 澤蘭藥 鍼液(10%) 0.2ml을 1日1回, 注入하였고. 藥 鍼은 26 gauge 1.0ml((株)綠十字醫療工業, 韓國)로 使用하였다.

(3) 關節炎 發病率 및 關節炎 指標 分析

對照群, CTX處理群 및 澤蘭藥 鍼群의 data를 2次 CII 接種 후 부터 1週日 間隔으로 DBA/1J 생쥐의 各 4個의 다리에서 測定하여 CIA 誘發 程度를 記錄하였다.

關節炎 指標 分析은 49日째 實驗 終了 후 關節炎 發病率 分析과 같은 方法으로 測定하였다.

關節炎 徵候 및 關節炎 指標 分析은 아래의 基準으로 發病率(incidence, %)을 決定하였다.

- 0 = no arthritis
- 1 = small degree of arthritis
- 2 = light swelling
- 3 = medium swelling
- 4 = severe swelling
- 5 = severe swelling and non-weight bearing

(4) 뒷다리 浮腫 測定

CII 接種 후 부터 49日까지 每 1週日 間隔으로 뒷다리의 浮腫值를 digital thickness gauge(Digimatic indicator IDC543-107FB, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan)로 왼쪽과 오른쪽 같은 部位를 2回 測定한 후 平均值를 使用하였

다. 浮腫値는 뒷다리 두께(paw Th, mm)로 表現하였다.

(5) 遲延型 過敏反應(DTH) 測定

5마리의 DBA/1J를 한 群으로 正常群, 對照群, CTX處理群 및 澤蘭藥鍼群을 만들어 1차 CII 接種 후 48日째에 CII(0.4mg/ml) 25 μ l를 D-PBS 에 녹인 후 오른쪽 귀에 皮膚에 塗布하였다. 24 時間 후 같은 部位의 오른쪽 귀의 두께를 digital thickness gauge로 測定하였다.

(6) 脾臟 무게의 變化

5마리의 DBA/1J를 한 群으로 正常群, 對照群, CTX處理群 및 澤蘭藥鍼群을 만들어 1次 CII 接種 후 49日에 實驗을 終了한 후 脾臟 무게를 測定하였다.

(7) 白血球, 血小板數의 變化

5마리의 DBA/1J를 한 群으로 正常群, 對照群, CTX處理群 및 澤蘭藥鍼群을 만들어 1次 CII 接種 후 49日에 實驗을 終了한 후 白血球, 血小板數를 Hematology로 自動 測定하였다.

(8) CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數 分析

5마리의 DBA/1J 생쥐를 한 群으로 對照群, CTX處理群 및 澤蘭藥鍼群을 만들어 各 群에서 分離한 脾臟細胞에 赤血球溶血液을 處理하여 赤血球를 除去하고 4 $^{\circ}$ C에서 免疫螢光染色 (immunofluorescence staining)을 實施하였고, 各 各에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19를 넣고 30分間 얼음에서 反應시켰다. 反應 후 3回 以上 磷酸緩衝生理食鹽水로 水洗한 후 流細胞螢光分析器(Becton Dickinson, USA)로 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數를 分析하였다.

(9) Total Protein의 變化

48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析器(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다.

(10) Creatinine의 變化

腎臟機能 指標인 creatinine을 測定하기 위하여 48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析器(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다.

(11) LDH의 變化

炎症作用 指標인 LDH을 測定하기 위하여 48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析器(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다.

3) 流細胞 螢光分析器(flow cytometer)를 利用한 脾臟細胞 分析

(1) 細胞培養

BALB/c 생쥐의 脾臟에서 脾臟細胞를 採取하여 2,000rpm에서 5分間 遠心分離하여 細胞를 回收하였다. 이에 赤血球溶血液 2ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C 恒溫水槽에 5分間 放置하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 添加하여 2,000rpm에서 5分間 遠心分離하여 使用하였다.

(2) 脾臟細胞의 活性化

BALB/c 正常생쥐에서 分離한 脾臟細胞를 各 24 well plate에 5 \times 10⁵ 細胞와 PWM(10 μ g/ml), 澤蘭藥鍼液(100 μ g/ml)을 加하여 7日間 培養한 후 脾臟附着細胞의 形態變化를 inverted microscope(\times 400)로 觀察하였다.

(3) 脾臟細胞 Cytokine 遺傳子 發現

脾臟細胞를 牛胎兒血清缺乏 RPMI-1640 培養液에서 1時間 동안 培養한 후 澤蘭藥鍼液(100 μ g/ml)을 處理하고 3時間 동안 培養器(37 $^{\circ}$ C, CO₂, Napco, USA)에 培養하였다. 培養한 후 2,000rpm에서 5分間 遠心分離하여 上層液을 除去한 후 RNAzol^B를 利用하여 細胞膜을 터트린 후 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

(4) 流細胞 螢光分析器를 利用한 免疫細胞數 分析

BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 分離한 脾臟 細胞에 赤血球溶血液을 處理하여 赤血球를 除去 하고 24 well plate를 利用하여 各 well에 5×10^5 細胞에 LPS($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), 澤蘭藥鍼液($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 등을 處理한 후 48時間 培養하였다. 培養 후 細胞들을 磷酸緩衝生理食鹽水(3% 牛胎兒血清, 0.1% NaNO_3)로 2回 水洗하였다. 4°C 에서 免疫螢光染色을 實施하였고, 各各에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19를 넣고 30分間 얼음에서 反應시켰다. 反應 후 3回 以上 磷酸緩衝生理食鹽水로 水洗한 후 流細胞 螢光分析器로 免疫活性細胞를 分析하였다. 滑膜細胞와 脾臟細胞 分析은 CellQuest 프로그램을 利用하여 CD4^+ , CD8^+ 과 CD19^+ 細胞의 比率(gated, %)을 算出하였다.

3. 統計 處理

實驗結果는 mean \pm standard error로 記錄하였다. 有意性 檢證은 Student's t test⁵⁹⁾를 利用하여 分析하였다.

III. 成 績

1. 人體 滑膜細胞 分離 및 細胞 增殖에 미치는 影響

1) in vitro에서의 細胞毒性

細胞毒性을 觀察한 結果, 對照群의 細胞生存率(O.D. 값)이 1.44 ± 0.08 로 나타났으며, 澤蘭藥鍼液 處理群 各各의 生存率은 1.46 ± 0.10 , 1.37 ± 0.12 , 1.40 ± 0.08 , 1.34 ± 0.07 , 1.16 ± 0.12 , 0.91 ± 0.11 로 1, 10, 50, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群은 細胞毒性이 有意한 減少가 없었고, 200과 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群은 有意하게 減少하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$).(Table 1, Fig. 1)

Table 1. The Cytotoxicity Effects of LH-AS on Human Synovial Cells

Drugs	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Optical Density (O.D., 540nm)	Decrease (%)
Control	0	1.44 ± 0.08	
	1	1.46 ± 0.10	-1.4
	10	1.37 ± 0.12	4.9
LH-AS	50	1.40 ± 0.08	2.8
	100	1.34 ± 0.07	6.9
	200	$1.16 \pm 0.12^*$	19.4
	400	$0.91 \pm 0.11^{**}$	36.8

Human Synovial Cells were treated with various concentration Lycopi Herba Aqua-acupuncture Solution(LH-AS). The results are expressed the mean \pm S.E(N=6).

Statistically significant value compared with control group data by t test(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

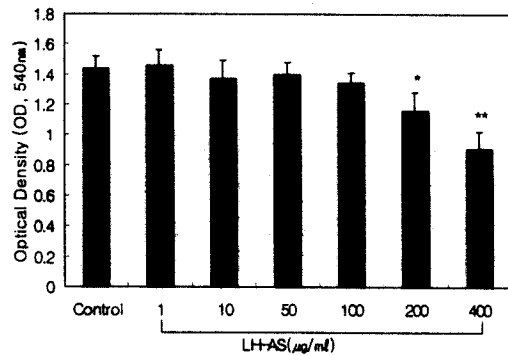


Fig. 1. The Cytotoxicity Effects of LH-AS on Human Synovial Cells

2) IL-6, IL-1 β , TNF- α 遺傳子 發現 分析

IL-6 遺傳子 發現의 最高값(Ht)에서 media(RPMI1640) 對照群(lane 1)은 42였고, rIL-6 만을 處理한 群(lane 2)은 135였으며, rIL-6와 澤蘭藥鍼液 並行處理群에서 藥鍼液 200, 100, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群(lane 3, 4, 5)은 各各 55, 64, 84로 나타났다.(Table 2, Fig. 2)

IL-1 β 遺傳子 發現의 最高값(Ht)에서 media 對照群(lane 1)은 162였고, rIL-6만을 處理한 群 (lane 2)은 147이었으며, rIL-6과 澤蘭藥鍼液 並行 處理群에서 藥鍼液 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群 (lane 3, 4, 5)은 各各 78, 64, 84로 나타났다. (Table 2, Fig. 2)

TNF- α 遺傳子 發現의 最高값(Ht)에서 media 對照群(lane 1)은 155였고, rIL-6만을 處理한 群(lane 2)은 185였고, rIL-6와 澤蘭藥鍼液 並行 處理群에서 藥鍼液 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群(lane 3, 4, 5)은 各各 75, 105, 118로 나타났다. (Table 2, Fig. 2)

Table 2. The Inhibitory Effects of LH-AS on Cytokine Gene Expression in Human Synovial Cells

Drugs	LH-AS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cytokine gene expression(Ht)					
		IL-6	Decrease (%)	IL-1 β	Decrease (%)	TNF- α	Decrease (%)
RPMI1640-media	0	42		162		155	
	0	135		147		185	
rIL-6 (100U/ml)	200	55	59.3	78	46.9	75	59.5
	100	64	52.6	64	56.5	105	43.2
	50	84	37.8	84	42.9	118	36.2

Human Synovial Cells were cultured with LH-AS and rIL-6 for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; Lane 1, RPMI-1640 media control; Lane 2, rIL-6(100U/ml); Lane 3, rIL-6 + LH-AS(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Lane 4, rIL-6 + LH-AS(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Lane 5, rIL-6 + LH-AS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

澤蘭藥鍼液에 의한 IL-6의 分泌量은 對照群은 $100 \pm 6.1\%$ 였고, 藥鍼液 200과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群은 $76.0 \pm 5.2\%$ 와 $75.0 \pm 4.6\%$ 나타나 有意한 減少를 나타내었으며($p < 0.01$), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群은 $95 \pm 7.9\%$ 로 有意한 變化가 없었다.(Table 3, Fig. 3)

Table 3. Suppression of IL-6 Production by Human Synovial Cells Culture by LH-AS

Drugs	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-6 Production (%/control data)	Decrease (%)
Control	0	100 ± 6.1	
	10	95 ± 7.6	5
LH-AS	100	$75 \pm 4.6^{**}$	25
	200	$76 \pm 5.2^{**}$	24

Fig. 2. The Inhibitory Effects of LH-AS on Cytokine Gene Expression in Human Synovial Cells

Human Synovial Cells(5×10^5 cell/well) were incubated with various concentrations of LH-AS for 1hr and stimulated with 100U/ml

- 3) IL-6와 IL-1 β 分泌量 分析
 ① IL-6 分泌量

rIL-6. After 48hrs incubation, the culture supernatants were collected, centrifuged, dialysed, and filtered to remove the LH-AS. IL-6 Production was bioassayed(B9.55 cell) as described in Material and Methods. The results are expressed the mean \pm S.E(N=6).

Statistically significant value compared with only rIL-6 group data by t test(**p<0.01).

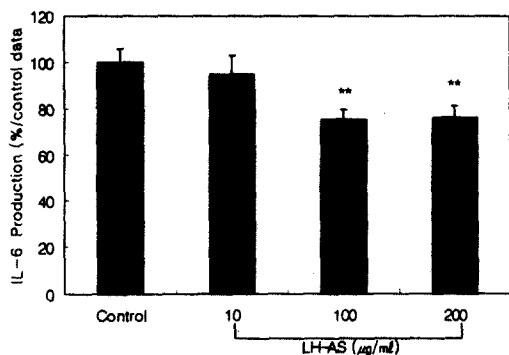


Fig. 3. Suppression of IL-6 Production by Human Synovial Cells Culture by LH-AS

② IL-1 β 分泌量

澤蘭藥碱液에 의한 IL-1 β 의 分泌量은 對照群은 27.0 \pm 2.8 ng/ml였고, 藥碱液 200과 100 μ g/ml 處理群에서 13.0 \pm 2.7과 15.0 \pm 2.3 ng/ml로 有意하게 抑制되었으며(p<0.001, p<0.01), 藥碱液 10 μ g/ml 處理群은 23.0 \pm 3.2ng/ml으로 若干의 抑制를 보였으나 有意한 減少는 나타나지 않았다. (Table 4, Fig. 4)

Table 4. Suppression of IL-1 β Production by Human Synovial Cells Culture by LH-AS

Drugs	Dose (µg/ml)	IL-1 β Production (ng/ml)	Decrease (%)
Control	0	27.0 \pm 2.0	
	10	23.0 \pm 3.2	14.8
LH-AS	100	15.0 \pm 2.3**	44.4
	200	13.0 \pm 2.7***	51.9

Human Synovial Cells(5 \times 10⁵cell/well) were incubated with various concentrations of LH-AS for 1hr and stimulated with 100U/ml rIL-6. After 48hrs incubation, the culture supernatants were collected, centrifuged, dialysed, and filtered to remove the LH-AS. IL-1 β Products was assayed using ELISA kit(R&B system) as described in Material and Methods. The results are expressed the mean \pm S.E(N=6).

Statistically significant value compared with only rIL-6 group data by t test(**p<0.01, ***p<0.001).

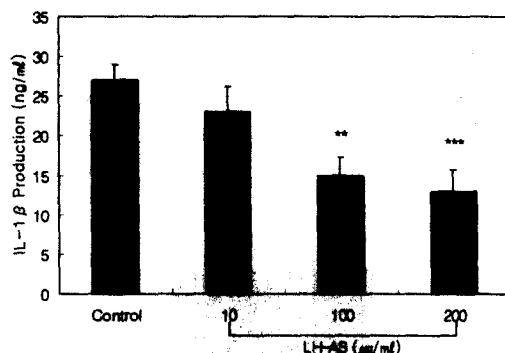


Fig. 4. Suppression of IL-1 β Production by Human Synovial Cells Culture by LH-AS

4) 滑膜細胞의 增殖 抑制

滑膜細胞 增殖은 media(RPMI1640) 對照群이 2483 \pm 431 cpm 이었고, rIL-6만을 處理한 群은 14470 \pm 2019cpm이었다. rIL-6과 澤蘭藥碱液 並行處理群에서 藥碱液 200과 100 μ g/ml 處理群은 各各 6515 \pm 2057, 8647 \pm 2410cpm으로 나타나 rIL-6만을 處理한 群에 比하여 有意한 抑制效果를 나타내었다(p<0.01, p<0.05). 藥碱液 10과 1 μ g/ml 處理群에서도 各各 12528 \pm 3249, 13996 \pm 2536 cpm으로 rIL-6만을 處理한 群보다 減少하였으나 有意한 變動은 없었다.(Table 5, Fig. 5)

Table 5. The Inhibition Effects of LH-AS on rIL-6 Induced Human Synovial Cells Proliferation

Drugs	LH-AS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell Proliferation (cpm)	Decrease (%)
RPMI1640 -media	0	2483 \pm 431	
	0	14470 \pm 2019	
rIL-6 (100U/ml)	200	6515 \pm 2057**	55.0
	100	8647 \pm 2410*	40.2
	10	12528 \pm 3249	13.4
	1	13996 \pm 2536	3.3

Human Synovial Cells were stimulated with or without 100U/ml rIL-6 for 48 hrs. The results are expressed the mean \pm S.E (N=6). RPMI-1640 media control; rIL-6(100U/ml); rIL-6 + LH-AS (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Lane 4, rIL-6 + LH-AS(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rIL-6 + LH-AS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and rIL-6 + LH-AS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Statistically significant value compared with only rIL-6 group data by t test(*p<0.05, **p<0.01).

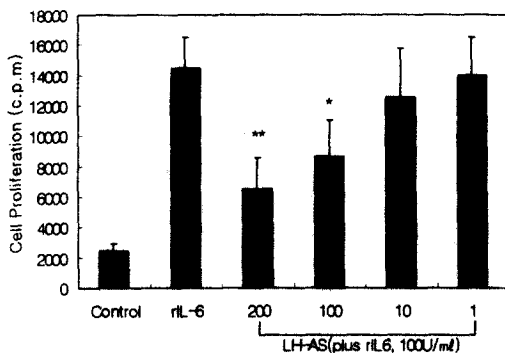


Fig. 5. The Inhibition Effects of LH-AS on rIL-6 Induced Human Synovial Cells Proliferation

2. Collagen으로 誘發시킨 생쥐의 關節炎에 미치는 影響

1) 關節炎의 發病率

CIA의 發病率에서 對照群은 CII 1차 接種(0日)을 始點으로 2次 booster 接種(21日)以後부터 關節炎이 發病하기 始作하여 28, 35, 42 및 49日에 15, 58, 95 및 96%로 CIA가 나타나, 21日以後는 모든 DBA/1J 생쥐에서 觀察되었다.

CTX處理群은 CII 1차 接種(0日)을 始點으로 28日以後부터 關節炎이 發病되기 始作하여 35, 42 및 49日에 15, 20 및 21%로 觀察되었다.

澤蘭藥鍼群은 CII 1차 接種(0日)을 始點으로 21日以後부터 關節炎이 發病되기 始作하여 28, 35, 42 및 49日에 5, 50, 74 및 79%로 觀察되었다.(Table 6, Fig. 6)

Table 6. The Effects of LH-AS and CTX on the Incidence of Murine CIA

Day	Incidence(%)			
	Control	CTX	Decrease (%)	LH-AS Decrease (%)
0	0	0		0
7	0	0		0
14	0	0		0
21	0	0		0
Day after First Immunization (CII)	28	15	100	5 66.7
	35	58	15	74.1 50 13.8
	42	95	20	78.9 74 21.9
	49	96	21	78.1 79 17.7

DBA/1J mice were immunized with 100 μg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were LH-AS(10%) on the Chok-Samni(S36) and CTX(10mg/kg, i.p.) for 48 days beginning on the day after the First Immunization. Incidence(%) was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean \pm S.E of 5 mice.

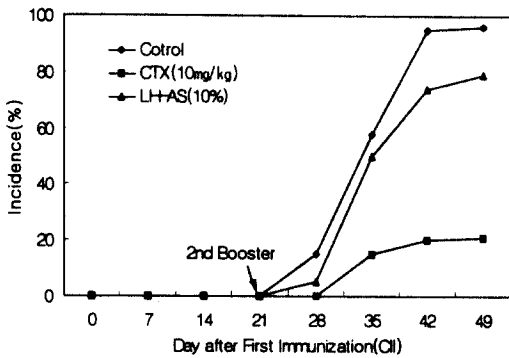


Fig. 6. The Effects of LH-AS and CTX on the Incidence of Murine CIA

2) 뒷다리浮腫의變化

뒷다리浮腫에서 CII 1차接種(0日)을始點으로對照群의浮腫은 booster接種(21日)以後부터發生하여 1.67±0.01mm/21日, 1.80±0.02mm/28日, 2.20±0.03mm/35日, 2.40±0.02mm/42日, 2.46±0.03mm/49日로急激히 나타나기始作하였고 28日以後에는 모든 DBA/1J 생쥐에서觀察되었다.

CTX處理群의浮腫은 1.65±0.02mm/28日, 1.68±0.03mm/35日, 1.71±0.02mm/42日, 1.74±0.05mm/49日로觀察되어顯著的抑制效果가 있었다 (p<0.001).

澤蘭藥鍼群의浮腫은 1.65±0.04mm/28日, 1.75±0.04mm/35日, 1.87±0.03mm/42日, 1.91±0.04mm/49日로觀察되어顯著的抑制效果가 있었다 (p<0.001).(Table 7, Fig. 7)

Table 7. The Effects of LH-AS and CTX on the Hind Paw Thickness in Murine CIA

Day	Hind Paw Th.(mm)				
	Control	CTX	Decrease(%)	LH-AS	Decrease(%)
0	1.68±0.01	1.65±0.01		1.63±0.01	
7	1.65±0.01	1.64±0.01		1.62±0.01	
14	1.67±0.01	1.65±0.01		1.65±0.01	
21	1.67±0.01	1.66±0.01		1.66±0.01	
28	1.80±0.02	1.65±0.02***	8.3	1.65±0.04***	8.3
35	2.20±0.03	1.68±0.03***	23.6	1.75±0.04***	20.5
42	2.40±0.02	1.71±0.02***	28.8	1.87±0.03***	22.1
49	2.46±0.03	1.74±0.05***	29.3	1.91±0.04***	22.4

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. Hind Paw Thickness was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(***p<0.001).

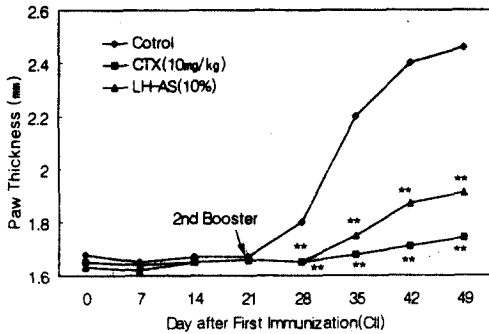


Fig. 7. The Effects of LH-AS and CTX on the Hind Paw Thickness in Murine CIA

3) 關節炎 指標(AI)

關節炎 指標(AI)는 CII 1次 接種(0日)을 始點으로 49日인 實驗 終了 후 살펴보았는데, CIA 생쥐인 對照群은 7.7±0.22로 나타났다.

澤蘭藥鍼群과 CTX處理群은 各各 5.5±0.44, 0.46±0.12로 對照群에 비하여 顯著的 抑制 效果를 나타내었다(p<0.001).(Table 8, Fig. 8)

Table 8. The Effects of LH-AS and CTX on the Arthritis Index(AI) in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Arthritis Index (AI)	Inhibition (%)
Control		5	7.7 ± 0.22	
CTX	10mg/kg	5	0.46 ± 0.12***	94.0
LH-AS	10%	5	5.5 ± 0.44***	28.6

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The AI was calculated from measurement taken the day after the final drug treatment. Each point represents the mean ± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with

control data by t test(***p<0.001).

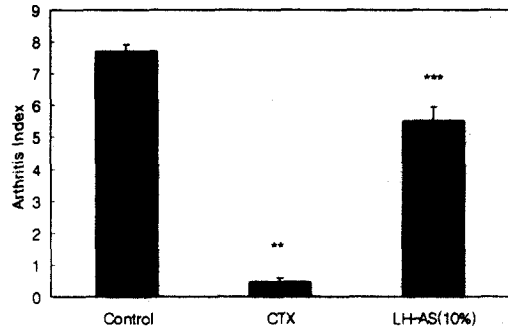


Fig. 8. The Effects of LH-AS and CTX on the Arthritis Index(AI) in Murine CIA

4) 遲延型 過敏反應(DTH)

正常群은 귀의 두께가 0.01±0.001mm였고, CII를 免疫한 對照群은 귀의 두께가 0.31±0.02mm로 正常群에 비하여 浮腫이 크게 增加하여 CII에 대한 遲延型 過敏反應을 觀察할 수 있었다.

澤蘭藥鍼群과 CTX處理群이 各各 0.14±0.03, 0.18±0.01mm로 나타나 對照群에 비하여 두群 모두 顯著的 抑制를 나타내었다(p<0.001).(Table 9.)

Table 9. The Effects of LH-AS and CTX on DTH Skin Reaction in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Increase in Ear Thickness(mm)	Increase (%)
Normal		5	0.01 ± 0.001	
Control		5	0.31 ± 0.02	
CTX	10mg/kg	5	0.18 ± 0.01***	41.9
LH-AS	10%	5	0.14 ± 0.03***	54.8

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were done with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice

were painted with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. After 24hrs, the thickness of the ear was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean \pm S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(***p<0.001).

5) 脾臟 무게

脾臟 무게는 정상군은 0.147 \pm 0.004 g이었고, C II를 면역한 對照群은 0.132 \pm 0.009g으로 정상群에 비하여 減少하였으며, 澤蘭藥鍼群 및 CTX處理群은 各各 0.171 \pm 0.007 및 0.257 \pm 0.008g으로 나타나 두 群 모두 對照群에 비하여 有意한 抑制를 나타내었다(p<0.001).(Table 10.)

Table 10. The Effects of LH-AS and CTX on Spleen Weight in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Change of Spleen Weight(g)	Inhibition (%)
Normal		5	0.147 \pm 0.004	
Control		5	0.132 \pm 0.009	
CTX	10mg/kg	5	0.259 \pm 0.008***	96.2
LH-AS	10%	5	0.171 \pm 0.007***	29.5

DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47days after the first immunization. Spleen weight was measured using a digital electronic balance. each point represents the mean \pm S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(***p<0.001).

6) 白血球, 血小板數의 變化

白血球 數의 變化에서는 정상群은 6.4 \pm 0.15($\times 10^3$ /mm³)였고, C II를 면역한 對照群은 10.2 \pm 0.21($\times 10^3$ /mm³)로 觀察되었다.

澤蘭藥鍼群 및 CTX處理群은 各各 7.5 \pm 0.27, 4.1 \pm 0.18($\times 10^3$ /mm³)로 나타나 두 群 모두 對照群에 비하여 有意한 減少를 나타내었다(p<0.001).

血小板 數의 變化에서는 정상群은 782 \pm 24.5($\times 10^3$ /mm³)였고, C II를 면역한 對照群은 832 \pm 28.1($\times 10^3$ /mm³)로 觀察되었다.

澤蘭藥鍼群 및 CTX處理群은 各各 792 \pm 23.5, 441 \pm 20.4($\times 10^3$ /mm³)로 나타나, CTX處理群은 對照群에 비하여 有意한 減少를 나타내었다(p<0.001).(Table 11.)

Table 11. The Effects of LH-AS and CTX on White Blood Cell and Platelet in Murine CIA

Drugs	Dose	N	WBC ($\times 10^3$ /mm ³)	Decrease(%)	Platelet ($\times 10^3$ /mm ³)	Decrease(%)
Normal		5	6.4 \pm 0.15		782 \pm 24.5	
Control		5	10.2 \pm 0.21		832 \pm 28.1	
CTX	10mg/kg	5	4.1 \pm 0.18***	59.8	441 \pm 20.4***	47.0
LH-AS	10%	5	7.5 \pm 0.27***	26.5	792 \pm 23.5	4.8

DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47days after the first immunization. WBC and Platelet was measured using a Minos Hematology. each point represents the mean \pm S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(***p<0.001).

7) CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞 分析

① CD4⁺細胞數

脾臟細胞內的 CD4⁺細胞數에서 對照群(C)은 6.5%였고, CTX處理群(D)은 6.4%로 觀察되었고, 澤蘭藥鍼群(E, F)은 各各 8.2%와 9.1%로 平均 8.7%로 나타났다.(Table 12, Fig. 9)

Table 12. The Effects of LH-AS on the Expression of CD4⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

Drugs	Dose	N	CD4 ⁺ T Cells(%)	Increase (%)
Control		5	6.5	
CTX	10mg/kg	5	6.4	-1.5
LH-AS	10%	5	8.7	33.8

DBA/1J mice were immunized with 100μg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10μg of CII in PBS into the right ear 47days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two group treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) showed increased number of CD4⁺ T cells.

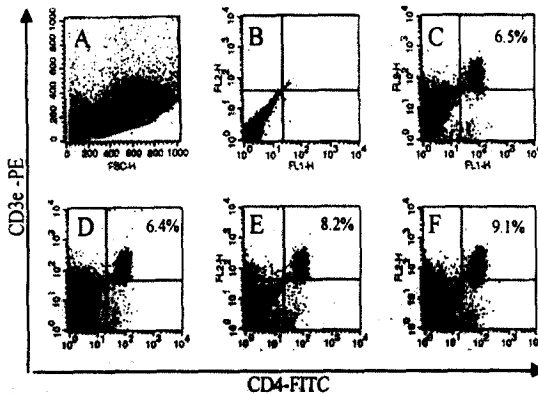


Fig. 9. The Effects of LH-AS on the

Expression of CD4⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

DBA/1J mice were immunized with 100μg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10μg of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) were backscattered onto a dot-plot of CD3e-PE versus CD4-FITC. B, Not stain; C, Control; D, 10μg/ml CTX; E-F, LH-AS on the Chok-Samni(S36) were stained with CD3e-PE/CD4-FITC. Two group treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) showed increased number of CD4⁺ T cells.

② CD8⁺細胞數

脾臟細胞內的 CD8⁺細胞數에서 對照群(C)은 1.80%였고, CTX處理群(D)은 0.17%로 觀察되었으며, 澤蘭藥鍼群(E, F)은 各各 3.07%와 3.40%로 平均 3.24%로 나타나 對照群에 비하여 增加되었다.(Table 13, Fig. 10)

Table 13. The Effects of LH-AS on the Expression of CD8⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

Drugs	Dose	N	CD8 ⁺ T Cells(%)	Increase (%)
Control		5	1.80	
CTX	10mg/kg	5	0.17	-90.6
LH-AS	10%	5	3.24	80.0

DBA/1J mice were immunized with 100μg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice

were injected with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two group treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) showed increased number of CD8⁺ T cells.

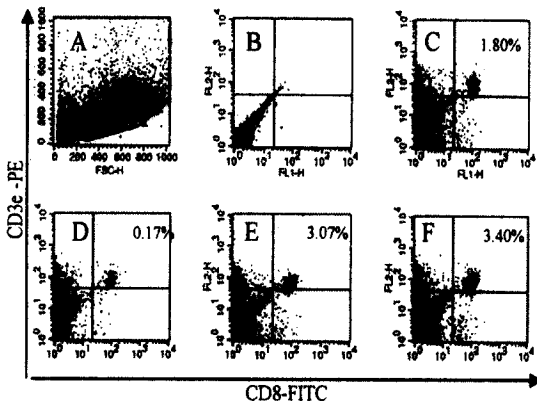


Fig. 10. The Effects of LH-AS on the Expression of CD8⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) were backscattered onto a dot-plot of CD3e-PE versus CD8-FITC. B, Not stain; C, Control; D, 10 μ g/ml CTX; E-F, LH-AS on the Chok-Samni(S36) were stained with CD3e-PE/CD8-FITC. Two group treated with LY1 Aqua-acupuncture solution on the Chok-Samni(S36) showed increased number of CD8⁺ T cells.

③ CD19⁺細胞數

脾臟細胞內的 CD19⁺細胞數에서 對照群(I)은 67.3%였고,

澤蘭藥鍼群(II) 및 CTX處理群(III)은 各各 43.6 및 32.2%로 나타나 두 群 모두 對照群에 비하여 減少하였다.(Table 14, Fig. 11)

Table 14. The Effects of LH-AS on the Expression of CD19⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

Drugs	Dose	N	CD19 ⁺ B Cells(%)	Decrease (%)
Control		5	67.3	
CTX	10mg/kg	5	32.2	52.2
LH-AS	10%	5	43.6	32.2

DBA/1J mice were immunized with 100 μ g of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p.) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 μ g of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two group treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) showed decreased number of CD19⁺ B cells.

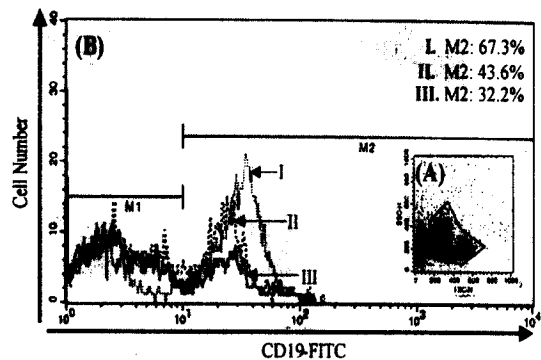


Fig. 11. The Effects of LH-AS on the Expression of CD19⁺ in Spleen Cells of Murine CIA

DBA/1J mice were immunized with 100 µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) and CTX(i.p) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10 µg of CII in PBS into the right ear 47days after the first immunization. The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) were backscattered onto a dot-plot of CD19-FITC(B). I, Control; II, LH-AS on the Chok-Samni(S36) ; III, CTX(10µg/kg) were stained with CD19-FITC. Two group treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) showed Increased number of CD19⁺ B cells.

8) Total Protein의 변화

Total protein의 변화에서 DBA/1J 생쥐 正常群은 5.17±0.24g/dl였고, 對照群은 5.89±0.18g/dl로 觀察되었으며, 澤蘭藥鍼群은 5.41±0.16g/dl로 나타나 對照群에 비하여 有意하게 減少하였다 (p<0.05). (Table 15.)

Table 15. The Effects of LH-AS on the Total Protein in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Total Protein (g/dl)	Decrease (%)
Normal		5	5.17±0.24	
Control		5	5.89±0.18	
LH-AS	10%	5	5.41±0.16*	8.1

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36)

for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10µg of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. Total protein was measured using Biochemistry analysis(550 express, CIBA-CORNING). Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(*p<0.05).

9) Creatinine의 변화

Creatinine의 변화에서 DBA/1J 생쥐 正常群은 0.24±0.02mg/dl였고, 對照群은 0.32±0.01mg/dl로 觀察되었으며, 澤蘭藥鍼群은 0.30±0.02mg/dl로 對照群에 비하여 減少하였지만, 有意한 變化는 나타나지 않았다.(Table 16.)

Table 16. The Effects of LH-AS on the Creatinine in Murine CIA

Drugs	Dose	N	Creatinine (mg/dl)	Decrease (%)
Normal		5	0.24±0.02	
Control		5	0.32±0.01	
LH-AS	10%	5	0.30±0.02	6.3

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10µg of CII in PBS into the right ear 47 days after the first immunization. Creatinine was measured using Biochemistry analysis(550 express, CIBA-CORNING). Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

10) LDH의 변화

LDH의 변화에서 DBA/1J 생쥐 正常群은 245

±15.7U/L이었고, 對照群은 1,139±43.9U/L로 觀察되었으며, 澤蘭藥鍼群은 594±23.9U/L로 나타나 對照群에 비하여 顯著的한 減少를 나타내었다 (p<0.001).(Table 17)

Table 17. The Effects of LH-AS on the Lactate Dehydrogenase in Murine CIA

Drugs	Dose	N	LDH (U/L)	Decrease (%)
Normal		5	245±15.7	
Control		5	1,139±43.9	
LH-AS	10%	5	594±23.9***	47.8

DBA/1J mice were immunized with 100µg of CII on CFA on days 0 and 21. The mice were treated with LH-AS on the Chok-Samni(S36) for 48 days beginning on the day after the first immunization. The mice were injected with 10µg of CII in PBS into the right ear 47days after the first immunization. LDH was measured using Biochemistry analysis(550 express, CIBA -CORNING). Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control data by t test(***p<0.001).

3. 流細胞 螢光分析器를 利用한 脾臟細胞 分析

1) 脾臟細胞의 活性化

어떠한 處理도 하지 않은 對照群(A)은 附着細胞들이 若干의 活性化가 보였고, PWM處理群(B)은 浮游細胞의 活性化(✓표)를 나타냈다. 澤蘭藥鍼液 處理한 후 4日째(C)에는 浮游細胞의 減少와 附着細胞의 活性化(✓)가 對照群에 비하여 增加되었고, 7日째(D)에는 浮游細胞의 急激한 減少와 附着細胞의 顯著한 活性化(✓)가 對照群에 비하여 크게 增加되었다.(Fig. 12)

Fig. 12. The Effects of LH-AS on the Activation of Spleen Cells

spleen cells were cultured in 24 well plate for 7 days. spleen cells divided into; A, non-treatment; B, PWM(10µg/ml); C, LH-AS treatment(100µg/ml) for 4 days; D, LH-AS treatment(100µg/ml) for 7 days. They show activation spleen cells(arrow).

2) IL-12 遺傳子 發現

IL-12(p35) 遺傳子 發現은 最高값이 media (RPMI1640) 對照群(lane 1)은 46이었고, 澤蘭藥鍼液 10, 50 및 100µg/ml을 脾臟細胞에 處理한 處理群(lane2, 3, 4)은 各各 121, 124 및 87로 나타나 모든 藥鍼處理群이 對照群에 비하여 IL-12 遺傳子 發現이 增加하였다.(Table. 19, Fig. 13)

Table 19. The Effects of LH-AS on IL-12(p35) Gene Expression in Spleen Cells Culture

Drugs	Dose (µg/ml)	IL-12(p35) Gene Expression(Ht)	Increase (%)
Control	0	46	
	10	121	163
LH-AS	50	124	169.6
	100	87	89.1

Mice spleen cells were cultured with LH-AS for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; Lane 1, RPMI-1640 media control; Lane 2, LH-AS(10 μ g/ml); Lane 3, LH-AS(50 μ g/ml); Lane 4, LH-AS(100 μ g/ml).

for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; Lane 1, RPMI-1640 media control; Lane 2, LH-AS(10 μ g/ml); Lane 3, LH-AS(50 μ g/ml); Lane 4, LH-AS(100 μ g/ml).

Fig. 13. The Effects of LH-AS on IL-12(p35) Gene Expression in Spleen Cells Culture

Mice spleen cells were cultured with LH-AS for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; Lane 1, RPMI-1640 media control; Lane 2, LH-AS(10 μ g/ml); Lane 3, LH-AS(50 μ g/ml); Lane 4, LH-AS(100 μ g/ml); internal control(β -actin).

3) IFN- γ 遺傳子 發現

IFN- γ 遺傳子 發現은 最高값이 media (RPMI1640) 對照群(lane 1)은 43이었고, 澤蘭藥 液 10, 50 및 100 μ g/ml를 脾臟細胞에 處理한 處理群(lane 2, 3, 4)은 各各 54, 118 및 109로 나타나, 모든 藥液處理群이 對照群에 비하여 增加하였다.(Table 20, Fig. 14)

Table 20. The Effects of LH-AS on IFN- γ Gene Expression in Spleen Cells Culture

Drugs	Dose (μ g/ml)	IFN- γ Gene Expression(Ht)	Increase (%)
Control	0	43	
	10	54	25.6
LH-AS	50	118	174.4
	100	109	153.5

Mice spleen cells were cultured with LH-AS

Fig. 14. The Effects of LH-AS on IFN- γ Gene Expression in Spleen Cells Culture

Mice spleen cells were cultured with LH-AS for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; Lane 1, RPMI-1640 media control; Lane 2, LH-AS(10 μ g/ml); Lane 3, LH-AS(50 μ g/ml); Lane 4, LH-AS(100 μ g/ml); internal control(β -actin).

4) 脾臟細胞 培養에 대한 免疫細胞數

① CD4⁺細胞數

培養된 脾臟細胞內의 CD4⁺細胞數에서 對照群(B)은 31.4%였고, LPS處理群(C)은 36.1% 對照群에 비하여 增加되었으며, 澤蘭藥液處理群(D)은 23.4%로 對照群에 비하여 減少되었다.(Table 21, Fig. 15)

Table 21. The Effects of LH-AS on the Expression of CD4⁺ in Spleen Cells Culture

Drugs	Dose (μ g/ml)	CD4 ⁺ T Cells(%)	Decrease (%)
Normal	0	1.1	
Control	0	31.4	
LPS	10	36.1	-15.0
LH-AS	100	23.4	25.5

The spleen cells were washed twice and

analyzed by flow cytometer. Not stained for fluorescence, Control; RPMI1640-2% FBS, 10 μ g/ml LPS, 100 μ g/ml LH-AS treatment were stained with CD3e-PE/CD4-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD4⁺ T cells.

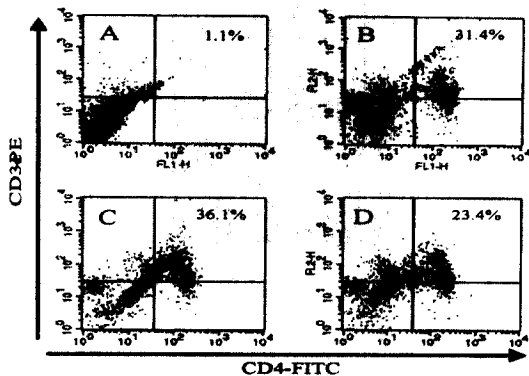


Fig. 15. The Effects of LH-AS on the Expression of CD4⁺ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) Not stain; B, Control; C, 10 μ g/ml LPS; D, 100 μ g/ml LH-AS treatment were stained with CD3e-PE/CD4-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD4⁺ T cells.

② CD8⁺細胞數

培養된 脾臟細胞內的 CD8⁺細胞數에서 對照群(B)은 25.8%였고, 澤蘭藥液處理群(D)과 LPS處理群(C)은 各各 14.5 및 23.4%로 나타나 두 群 모두 對照群에 比하여 減少하였다.(Table 22, Fig. 16)

Table 22. The Effects of LH-AS on the Expression of CD8⁺ in Spleen Cells Culture

Drugs	Dose (μ g/ml)	CD8 ⁺ T Cells(%)	Decrease (%)
Normal	0	0.8	
Control	0	25.8	
LPS	10	23.4	9.3
LH-AS	100	14.5	43.8

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Not stained for fluorescence, Control; RPMI1640-2% FBS, 10 μ g/ml LPS, 100 μ g/ml LH-AS treatment were stained with CD3e-PE/CD8-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD8⁺ T cells.

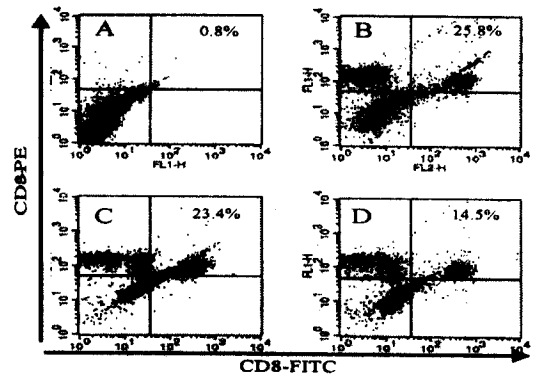


Fig. 16. The Effects of LH-AS on the Expression of CD8⁺ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) Not stain; B, Control; C, 10 μ g/ml LPS; D, 100 μ g/ml LH-AS treatment were stained with CD3e-PE/CD8-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD8⁺ T cells.

③ CD19⁺細胞數

培養된 脾臟細胞內的 CD19⁺細胞數에서 對照群

(I)은 57.5%였고,

澤蘭藥鍼液處理群(III) 및 LPS處理群(II)은 各 33.9 및 38.4%로 나타나 두 群 모두 對照群에 비하여 減少하였다.(Table 23, Fig. 17)

Table 23. The Effects of LH-AS on the Expression of CD19⁺ in Spleen Cells Culture

Drugs	Dose (μg/ml)	CD19 ⁺ B Cells(%)	Decrease (%)
Control	0	57.5	
LPS	10	38.4	33.2
LH-AS	100	33.9	41.0

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Not stained for fluorescence, Control; RPMI1640-2% FBS, 10μg/ml LPS, 100μg/ml LH-AS treatment were stained with CD19-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD19⁺ B cells.

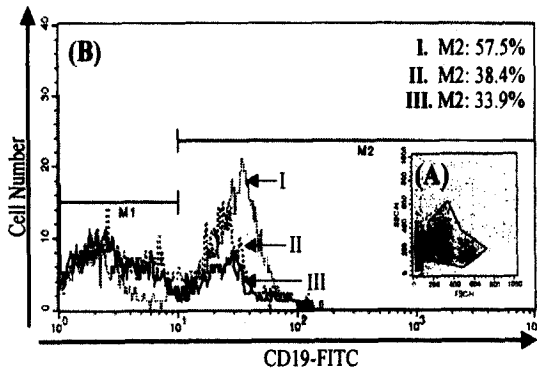


Fig. 17. The Effects of LH-AS on the Expression of CD19⁺ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(A) Not stain; B, Control; C, 10μg/ml LPS;

D, 100μg/ml LH-AS were stained with CD19-FITC. Two group treated with LH-AS treatment showed decreased number of CD19⁺ B cells.

IV. 考 察

關節(joint or articulation)은 骨과 骨사이가 一定한 間隔으로 사이를 두고 있어 骨 相互間에 運動이 行하여지는 곳⁽⁶⁰⁾으로, 關節疾患은 外傷, 感染, 代謝異常, 免疫異常 및 腫瘍 등의 原因에 의하여, 關節의 壓痛, 發熱, 紅斑, 滑膜滲出液, 滑膜肥厚, 關節運動의 制約 또는 摩擦音 등의 症狀이 있다^(61,62).

關節炎 중에서 류마토이드 關節炎은 慢性關節炎 중 退行性 關節疾患 다음으로 흔히 볼 수 있는 疾患으로, 滑液膜의 慢性的 肥大 및 炎症이 나타나 關節軟骨과 그 周圍組織을 破壞하여 初期에는 關節의 浮腫과 疼痛을 招來하나, 進行됨에 따라 特徵的인 關節變形 및 強直이 誘發되고 全身적으로 衰弱해지며^(3,62,63), 歐美에서는 全人口의 약 1-2%의 發病率을 보이며 그 중 80%의 患者는 慢性的 經過를 겪게되며⁽⁶⁴⁾, 年齡의 制限은 없으나 30~50歲 사이에 가장 흔히 보이고, 女性이 男性보다 약 3배 가량 好發하고 妊娠에 의해 症狀이 輕減되는 境遇도 있으나 50세 以後에는 性에 따른 頻度는 비슷해진다^(3,63,64).

류마토이드 關節炎의 原因은 明確히 밝혀지지 못한 狀態이나 假說의 原因이 提示되어 感染說(연쇄구균, diphtheroid, mycoplasma, 바이러스), 비타민缺乏症, 호르몬의 不調和 등의 說이 있으나 最近에는 自家免疫學的 反應으로 說明^(3,61-63)하고 있으며, 이는 自身の 蛋白質이나 組織을 異物質이라고 生覺하여 對抗하는 反應으로 이러한 自家免疫이 일어나는 理由 중의 하나는 感染 때문이다. 疾病을 일으키는 어떤 生物의 表面 抗原이 自身の 것과 너무 비슷하여 侵入者를 自身の 것으로 認識해서 攻擊하지 않다가 結局에는 찾아내게 되면 免疫系는 抗體를 만들게 되는데 이 抗體

들이 自身の 組織과도 交叉反應을 하게 되어 自家免疫反應이 나타나게 된다^{65,66}.

治療로는 一般的 保存療法, 藥物治療, 手術治療로 크게 나눌 수 있다. 一般的 保存療法은 炎症이 있는 關節을 機能的位置를 維持하여 固定시켜 疼痛을 解消시키고 固定位置에서 筋肉運動을 시켜 筋力弱화와 筋萎縮을 防止하면서 適切な 營養供給과 安定, 休息, 誘發要因에 대한 處置, 物理治療 등을 實施한다⁶⁷⁻⁷².

藥物療法으로는 現在까지 류마티드 關節炎에 대한 根治的인 治療藥은 開發되지 않았다. 現在 사용중인 藥劑로는 아스피린과 같은 살리실산염(salicylates), 비스테로이드성 消炎劑(non-steroidal antiinflammatory drugs), 항말라리아제(antimalarials), 금염(gold salts), 페니실라민(D-penicillamine), 副腎皮質호르몬(corticosteroids) 등이 있으나, 이러한 治療는 洋醫學的으로 原因이 正確히 糾明되지 않은 狀態에서 治療에 임하기 때문에 治療效率이 높지 않을 뿐만 아니라 藥物療法은 多樣한 全身性 副作用을 招來하여 治療보다도 副作用이 더욱 深刻해 지는 경우도 있다^{3,61,62}.

류마티드 關節炎은 韓醫學的으로 주로 風, 寒, 濕, 熱에의 感觸을 原因으로 發生되어 祛風, 散寒, 除濕, 清熱 등의 治療法을 施行한다³.

韓醫學的으로는 歷節風⁷³⁻⁷⁸, 鶴膝風^{76,79,80}, 白虎風^{75,76}, 白虎歷節風^{77,80-82}, 痛風^{76-79,81-85}, 痛痺^{77,79,81}, 痺痛⁸⁵, 痺症^{79,86}, 風痺^{73,74,76-78}, 痺證^{85,87,88}

등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있으며, 《素問·痺論》⁸⁹에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕外邪가 痺證의 重要한 原因이라고 言及했으며, 《金匱要略》⁷³에서는 “短氣自汗出歷節疼不可屈伸此皆飲酒汗出當風所致”라 하였고, 《巢氏諸病源候論》⁷⁴에서 “由人體虛 腠理開 故受風邪也”라 하였고, 《外臺秘要方》⁷⁵에서 “白虎病者大都是風寒暑濕之毒因虛所致將攝失理受此風邪經脈結滯血氣不行畜於骨節之間或在四肢肉色不變”, “血氣虛則汗出風冷搏於筋則不可屈伸爲歷節風也”라 하였으며, 《東垣十種醫書》⁸³에서 “彼痛風者 因血受熱 已自沸騰 其後 或涉冷水 或立濕地 或扇取涼

或臥當風 寒涼外搏 熱血 得寒 汚濁凝澁 所以作痛”이라 하였고, 《鍼灸聚英》⁸⁴에서 痛風의 原因은 風熱, 風濕, 血虛有痰이라 하였고, 《醫學入門》⁷⁶에서 “痛風…形怯瘦者 多內因 血虛有火 形肥勇者 多外因 風濕生痰 以其循歷遍身 曰歷節風 甚如虎咬 曰白虎風”, “痛多痰火 腫多風濕 然”, “鶴膝風…三陰虧損 風邪入 亦有虛火 陰血枯 所以病後 多此疾.”이라 하였다. 또한 《萬病回春》⁸²에서 “痛風者…謂之白虎歷節風都是血氣風濕痰火皆令作痛 或勞力寒水相搏 或酒色醉臥 當風取涼 或臥風濕之地 或雨汗濕衣 蒸體而成痛風 在上者多屬風 在下者多屬濕”이라 하였고, 《景岳全書》⁷⁸에서 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得而勝之而爲痺.”라 하였고, 《證治彙補》⁷⁹에서 “痛風卽內經痛痺也 因氣血虧損 濕痰濁血 流滯經絡 注而爲病 或客四肢 或客腰背百節 走痛攻刺 如風之善動 故曰痛風”, “內因六慾七情 或病後亡津 血熱沸騰 亦必外感六淫 而後骨節鑽痛 久則手足蹇攣 外因涉冷坐濕當風 亦必血熱而凝滯汚濁 所以作痛 甚則身體塊瘰 痛必夜甚者 血行于陰也”라 하였고, 《醫學心悟》⁸⁰에서 “痺者 痛也 風寒濕三氣雜之 合而爲痺也”라 하였고, 《醫林改錯》⁸⁶에서 痺症有瘀血說을 主張하였고, 《血證論》⁸⁵에서 “身體不仁 四肢疼痛 今名痛風 古曰痺證 虛人感受外風 客於脈分 則爲血痺”라 하였다. 이들은 크게 體虛感邪, 外邪入侵, 停痰留瘀로 區分되고, 人體의 陽氣陰精不足을 內因으로, 風寒濕熱之邪를 外因으로 볼 수 있다.

一般的으로 初期에는 邪實爲主하고 病位在肢體 皮肉經絡하나 病이 오래되면 正虛邪變 혹은 虛實 挾雜하고 病位則深하여 筋骨 혹은 臟腑에 侵犯한다고 하였다².

外因의 境遇는 體虛한데 起居失常 등으로 風, 寒, 濕, 熱邪가 皮膚, 血脈, 肌肉, 筋骨, 骨節, 經, 絡 등에 入하여 發病하고, 內因의 境遇는 七情, 飲食不節, 虛勞, 房勞 등으로 因해 病久而不去하고 復感於邪하여 臟腑의 虛實을 招來하여 內寒, 內風, 內濕, 內熱, 內燥, 氣虛, 血虛, 陰虛, 陽虛, 痰飲, 瘀血 등의 病理現象이 나타나면, 臟腑의 虛實을 調節하며 濕, 痰飲, 瘀血 등을 除去하기 위

해 除濕, 祛瘀, 治痰, 利水를 행하여 治療한다³⁾.

韓醫學에서 治療는 주로 鍼과 藥物療法 등을 利用하는데, 多用되는 經穴은 足三里⁵⁻¹¹⁾를 비롯하여 環跳, 合谷, 膝關, 委中, 肩髃, 絕骨, 天井 등¹¹⁷⁾이 있었고, 이 가운데 本 實驗에서 使用한 足三里(S36)는 足陽明胃經에 屬하며 胃經의 合穴으로써 五行上 土에 屬하고 六腑下合穴이고 回陽九鍼穴, 四總穴, 中風七處穴 중의 하나이며¹²⁾, 이穴의 效能은 調氣血, 理脾胃, 補虛弱하여 膝關節痛, 下肢麻痺, 下肢風濕痛, 浮腫, 腸胃疾患, 強壯, 貧血, 皮膚瘙癢症, 알레르기성 疾患, 産後血暈¹²⁻¹⁵⁾ 등의 疾患에 廣範圍하게 應用되어 왔다.

澤蘭은 唇形科(꿀풀과; Labiatae)에 屬한 섬싸리(Lycopus ramosissimus var. japonica Kita) 및 同屬近緣植物의 全草를 乾燥한 것¹⁸⁾으로, 性¹⁸⁻²¹⁾은 微溫無毒하고, 味는 苦辛甘¹⁸⁻²³⁾하며, 肝·脾에 入^{18,20)}하고, 效能¹⁸⁻²³⁾은 活血祛瘀, 行水消腫하여, 利關節, 養血氣, 長肌肉, 身面四肢浮腫, 骨節中水, 金瘡癰腫瘡膿, 血瘀水腫, 破宿血, 消癥瘕하며, 臨床에서는 澤蘭이 들어 있는 淸熱利水湯이 류마티드 關節炎²⁴⁾에, 絲瓜絡, 五靈脂, 玄胡索을 配伍하여 慢性風濕性關節炎²⁵⁾에, 外用으로 關節擦傷後腫痛²⁵⁾에 使用되고 있다.

藥鍼療法은 穴位注射療法, 水鍼療法¹²⁾이라고 하며 經絡學說의 原理에 依據하여 有關한 穴位나 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 精製된 各種藥物을 注入하여 刺鍼效果和 藥物의 藥理作用을 통하여 生體의 機能을 調整하고 疾病의 治療效果를 높이는 新鍼療法으로¹³⁾, 藥效가 빠르며 用量이 正確하고 藥物이 胃腸管에서 破壞되는 것을 피할 수 있으며 內服하기 힘든 患者에게 使用할 수 있는 長點이 있다^{12,14)}.

最近에 藥鍼療法을 利用한 實驗으로 免疫⁹⁰⁻¹⁰²⁾, 鎮痛¹⁰³⁻¹¹⁰⁾, 血壓降下^{108,109)}, 抗瀉下¹⁰⁵⁾, 消炎^{110,111)}, 抗腫瘍¹¹²⁾, 鎮痙¹¹³⁾, 副腎皮質機能回復¹¹⁴⁾, 抗血栓作用¹¹⁵⁾, 알코올中毒¹¹⁶⁾, 氣管上皮細胞再生¹¹⁷⁾, 血糖降下¹¹⁸⁾ 등에 대한 報告가 發表되었으며 臨床研究에 있어서도 腰扭傷¹¹⁹⁾, 肩關節周圍炎¹²⁰⁾, 諸般痛症¹²¹⁾, 老人泄瀉 및 陽痿症¹²²⁾, 血瘀形 慢性肝炎¹²³⁾, 上部消化器出血¹²⁴⁾, 濕疹¹²⁵⁾ 및 過敏性鼻炎

¹²⁶⁾ 등 多樣한 疾患에 治療效果가 있음이 報告되었고, 특히 關節炎에 대한 研究로는 秦艽²⁶⁾, 薏苡仁¹⁶⁾, 斑猫¹⁷⁾, 草龍膽²⁷⁾, 草烏²⁸⁾, 加味疎風活血湯藥鍼²⁹⁾ 등이 Adjuvant 關節炎에 有效함을 報告하였고, 藥物의 經口投與 方法을 통해 大羌活湯³⁰⁾, 桂枝芍藥知母湯³¹⁾, 骨擔草³²⁾, 秦艽³³⁾이 第II型 Collagen 誘發 關節炎에 미치는 影響을 報告하였다.

이에 著者는 本 實驗에서 澤蘭藥鍼이 Collagen으로 誘發시킨 關節炎에 대한 抑制效果를 究明하기 위해 藥鍼液의 細胞毒性 및 滑膜細胞 增殖을 觀察하였고, 炎症誘發 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 遺傳子 發現을 觀察하였으며, 滑膜細胞의 IL-6와 IL-1 β 分泌量 分析을 實施하였고, 또한 Collagen으로 誘發시킨 關節炎 DBA/1J 생쥐에 足三里에 澤蘭藥鍼하여 關節炎 發病率, 뒷다리 浮腫, 關節炎 指標, 遲延型 過敏反應, 脾臟 무게, 白血球數와 血小板數를 觀察하였고, 脾臟細胞內의 免疫細胞에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 免疫細胞인 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞 數를 살펴보고, total protein, 腎藏機能의 指標인 creatinine, 炎症作用의 指標인 LDH의 變化를 觀察 하였다. 그리고 澤蘭藥鍼液을 處理해 培養한 脾臟細胞의 活性化를 살펴보기 위해 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟細胞의 形態의인 變化를 inverted 顯微鏡($\times 400$)으로 觀察하였고, 流細胞 螢光分析器를 利用하여 脾臟細胞를 分析하여 IL-12, IFN- γ 遺傳子 發現을 觀察하였으며, 免疫細胞의 變化를 살펴보기 위해 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 LPS, 澤蘭藥鍼液을 處理하여 48 時間 동안 培養한 후 脾臟內 免疫細胞를 anti-CD3e, anti-CD4, anti-CD8 그리고 anti-CD19를 利用하여 流細胞 螢光分析器로 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數를 觀察하였다

關節炎 實驗에 있어 in vitro에서 滑膜細胞에 대한 細胞毒性을 살펴보았는데 測定方法은 澤蘭藥鍼液을 製造하여 動物細胞에서의 細胞毒性을 檢證하기 위하여 關節炎 患者의 滑膜組織에서 滑膜細胞를 分離하여 96 well plate에 分株하고, 澤蘭藥鍼液 濃度를 400, 200, 100, 50, 10 및 1 μ g/

ml로 處理하여 48時間 후에 SRB 方法⁴⁷⁾을 약간 變形하여 細胞毒성을 測定하였다. 對照群에 比하여 100, 50, 10 및 1 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群에서는 有意한 減少가 없었고, 200과 400 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群에서는 對照群의 細胞生存率(O.D 값)에 比하여 各各 19.4%와 37.2%의 有意한 減少를 보였다.(Table 1, Fig. 1) 그러나 이것은 澤蘭藥鍼液處理群의 滑膜細胞에 細胞毒성을 誘發했다기 보다는 培養條件에 影響을 招來한 結果라 思慮된다.

滑膜細胞의 IL-6, IL-1 β , TNF- α 遺傳子 發現 分析에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 는 代表的인 炎症誘發 cytokine으로 滑膜細胞에서 過剩生産되어 滑膜細胞의 增殖을 促進하는 것^{65,127,128)}으로 알려졌다. 滑膜細胞를 24 well plate에 分株한 후 rIL-6와 200, 100 및 50 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液을 并行處理하여 澤蘭藥鍼液에 의해 IL-1 β , IL-6, TNF- α 遺傳子 發現이 抑制되는지를 確認하기 위하여 澤蘭藥鍼液 處理 3時間 후에 培養終了한 다음 RNAzol^B로 滑膜細胞를 터트려 mRNA를 分離하였고, first strand cDNA 合成하여 PCR의 주형으로 使用하였다. PCR 生産物의 量은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 利用하여 最高값(height, Ht)으로 測定하였다.

IL-6 遺傳子 發現에서 rIL-6에 各各 200, 100 및 50 μ g/ml 澤蘭藥鍼液並行處理群은 rIL-6 單獨處理群에 比하여 59.3, 52.6 및 37.8%로 顯著한 抑制效果를 나타내었다.(Table 2, Fig. 2)

IL-1 β 遺傳子 發現에서 rIL-6에 各各 200, 100 및 50 μ g/ml 澤蘭藥鍼液並行處理群은 rIL-6 單獨處理群에 比하여 46.9, 56.5 및 42.9%로 顯著한 抑制效果를 나타내었다.(Table 2, Fig. 2)

TNF- α 遺傳子 發現에서 rIL-6에 各各 200, 100 및 50 μ g/ml 澤蘭藥鍼液並行處理群은 rIL-6 單獨處理群에 比하여 59.5, 43.2 및 36.2%로 顯著한 抑制效果를 나타내었다.(Table 2, Fig. 2)

以上の 結果로 澤蘭藥鍼液이 in vitro에서 滑膜細胞의 IL-6, IL-1 β 그리고 TNF- α 의 遺傳子 發現을 抑制한다는 것을 알 수 있었다.

滑膜細胞에서 澤蘭藥鍼液에 의한 IL-6와 IL-1

β 의 分泌量 抑制에 미치는 影響을 알아보기 위하여 滑膜細胞에 200, 100 및 10 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液을 處理하고 48時間 培養 후 上層液을 얻어, IL-6 分泌量 測定은 B9.55 細胞株로 bioassay를 遂行하였고, IL-1 β 는 ELISA로 分泌量을 測定하였다.

澤蘭藥鍼液에 의한 IL-6의 分泌量은 對照群에 比하여 200과 100 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群에서 各各 24와 25% 減少로 有意하게 IL-6의 分泌量이 抑制되었다. 10 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群은 對照群에 比하여 有意한 減少는 나타나지 않았다.(Table 3, Fig. 3)

澤蘭藥鍼液에 의한 IL-1 β 의 分泌量은 對照群에 比하여 200과 100 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群에서 各各 51.9와 44.4% 減少로, IL-1 β 의 分泌量이 顯著히 抑制되었다. 10 μ g/ml 澤蘭藥鍼液處理群은 對照群에 比하여 若干의 IL-1 β 分泌量 抑制를 보였으나 有意한 減少는 나타나지 않았다.(Table 4, Fig. 4)

이러한 結果는 澤蘭藥鍼液이 滑膜細胞에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 遺傳子 發現을 抑制한다는 RT-PCR 結果와 一致한다.

滑膜細胞 增殖 抑制 效果를 알아보기 위해 關節炎 患者에서 分離한 滑膜細胞 增殖은 rIL-6 單獨處理群과 rIL-6에 各各 200, 100, 10 및 1 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液並行處理群을 48時間 培養하여 [³H]-thymidine uptake assay를 修行하였다. 滑膜細胞 增殖은 rIL-6 單獨處理群 보다 rIL-6에 200과 100 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液並行處理群이 各各 55.0%와 40.2%의 顯著한 抑制效果를 나타내었다. 10과 1 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液並行處理群은 rIL-6 單獨處理群에 比하여 減少하였으나 有意한 減少는 없었다.(Table 5, Fig. 5)

이러한 結果는 滑膜細胞가 IL-6와 IL-1 β 를 過剩生産하여 增殖을 한다고 볼 때 澤蘭藥鍼液이 IL-6나 IL-1 β 遺傳子 發現을 抑制하여 滑膜細胞의 增殖을 抑制시킬 것으로 思慮된다.

澤蘭藥鍼液에 의한 Collagen으로 誘發시킨 關節炎 發病率(Incidence)로 抑制 效果를 살펴보기 위해 CII를 DBA/1J 생쥐에 1次 免疫시킨 후 每

日 1回 48日 동안 足三里에 澤蘭藥鍼하였다. CIA의 發病率에서 對照群은 booster 注射(21日째)以後부터 CIA가 나타나기 始作하였고, 28日以後에는 모든 DBA/1J 생쥐에서 觀察되었다.

CTX處理群은 35日째以後 發病되기 始作했으나 最終 49日째까지 78.1%의 顯著的 關節炎 抑制 效果를 觀察할 수 있었고, 澤蘭藥鍼群은 28日째부터 對照群에 비하여 發病率이 抑制되기 始作하여 42日째에는 21.9%, 最終 49日째에는 17.7%를 抑制하는 效果를 보였다.(Table 6, Fig. 6)

뒷다리 浮腫 抑制效果는 對照群은 booster 注射(21일째)以後부터 浮腫이 急激히 나타나기 始作하였고 28일以後는 모든 DBA/1J 생쥐에서 觀察되었다. CTX 處理群은 28日째以後 對照群에 비하여 8.3%에서 最終 49日째까지 29.3%의 顯著的 抑制 效果를 觀察할 수 있었고, 澤蘭藥鍼群은 28日째以後 對照群에 비하여 8.3%/28日, 20.5%/35日, 22.1%/42日, 22.4%/49日로 有意하게 抑制되었다.(Table 7, Fig. 7)

關節炎 指標(AI)에서는 48日째 實驗 終了 후 關節炎 指標를 보았는데, CIA 생쥐인 對照群에 비하여 CTX處理群은 94%의 抑制 效果를 나타내었고, 澤蘭藥鍼群은 28.6%의 抑制 效果를 나타내었다.(Table 8, Fig. 8)

遲延型 過敏反應(DTH)은 IV형 알레르기에 속하며, 抗原으로 Th1淋巴球가 同一한 抗原으로 再次 刺戟되어 IFN- γ 를 生成하고, 이것에 의해 活性化되는 大食細胞의 作用이 中心이 되는 炎症性 組織 傷害 反應이다^{65,128}. CII에 대한 細胞性 免疫反應은 遲延型 過敏反應으로 評價하며 正常群에 비하여 CII를 免疫한 對照群의 귀 浮腫이 크게 增加하여 CII에 대한 遲延型 過敏反應을 觀察할 수 있었다. 對照群에 비하여 CTX處理群에서는 41.9%로 顯著히 有意한 遲延型 過敏反應 抑制 效果를 나타내었고, 澤蘭藥鍼群에서는 54.8%의 顯著的 抑制 效果를 나타내었다.(Table 9.)

Collagen 誘發 關節炎(CIA) 생쥐에서 免疫細胞 增進을 脾臟 무게로 測定하였다. 正常群에 비하여 CII를 免疫한 對照群의 脾臟 무게가 減少하여 CII에 대한 免疫抑制를 觀察할 수 있었다. 對

照群에 비하여 CTX 處理群은 脾臟 무게가 96.2%의 有意한 回復 效果를 보였지만 이는 CTX에 대한 副作用으로 알려져 있으며, 澤蘭藥鍼群에서는 脾臟 무게가 29.5% 增加하여 有意한 回復率을 나타내었다.(Table 10.)

Collagen 誘發 關節炎(CIA) 생쥐에서 血球細胞數의 變化를 觀察하기 위해 白血球와 血小板數를 Hematology로 自動 測定하였다.

白血球數의 變化는 正常群에 비하여 CII의 免疫으로 인한 炎症作用으로 對照群이 59.4% 增加되었다. 白血球數에서 CTX處理群은 對照群에 비하여 59.8%의 有意한 減少 效果를 보였지만 이는 CTX에 대한 副作用으로 알려져 있으며, 澤蘭藥鍼群은 對照群에 비하여 26.5% 減少하여 有意한 回復率을 보였다.(Table 11.)

血小板數의 變化는 正常群에 비하여 CII를 免疫한 對照群이 6.0% 增加되었다. 血小板數에서 CTX處理群은 對照群에 비하여 47.0%의 有意한 減少 效果를 보였지만 이 또한 CTX에 대한 副作用으로 알려져 있으며, 澤蘭藥鍼群은 對照群에 비하여 4.8% 減少하여 回復하는 傾向은 있었지만 有意한 減少는 없었다.(Table 11.)

CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數의 變化를 살펴보기 위해 CII를 DBA/1J 생쥐에 1次 免疫시킨 후 每日 1回 48日 동안 足三里에 澤蘭藥鍼한 후 脾臟 免疫細胞에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 anti-CD3e, anti-CD4, anti-CD8 그리고 anti-CD19를 利用하여 流細胞 螢光分析器로 測定하였다.

CD4⁺細胞는 抗原을 B 淋巴球에 傳達하여 抗體 生成을 誘發시키는 機能이 있으며, CD8⁺細胞는 癌細胞와 같은 非正常的인 細胞를 直接 除去할 수 있는 機能이 있는 것으로 報告되고 있다^{129,130}.

CD4⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果 脾臟細胞內의 CD4⁺細胞數가 CTX處理群은 對照群에 비하여 큰 影響이 없었으나, 澤蘭藥鍼群은 對照群에 비하여 33.8%의 免疫細胞 增進이 觀察되었다.(Table 12, Fig. 12)

CD8⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果 脾臟細胞內의 CD8⁺細胞數가 CTX處理群은 對照群에 비하여

90.6%로 크게 減少하였으나, 澤蘭藥鍼群은 對照群에 비하여 80.0%의 免疫細胞 增進이 觀察되었다.(Table 13, Fig. 13)

B細胞의 數를 測定하는 單細胞群 抗體로 CD19와 CD20을 주로 使用하는데, CD19⁺細胞는 抗體를 直接 生産하여 外部物質을 中和시키는 體液性 免疫反應에 關與하는 것으로 알려져 있다¹³¹⁾.

CD19⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果 脾臟細胞內의 CD19⁺細胞數가 CTX處理群은 對照群에 비하여 52.2%로 減少하였고, 澤蘭藥鍼群은 對照群에 비하여 32.2%의 免疫細胞 減少가 觀察되었다.(Table 14, Fig. 14)

Collagen 誘發 關節炎(CIA) 생쥐에서 血清 total protein의 變化를 살펴보기 위해 48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析機(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다. total protein은 DBA/1J 정상생쥐보다 CIA 생쥐인 對照群에서 13.9%의 增加를 나타내었다. 澤蘭藥鍼群의 total protein은 對照群에 비하여 8.1%의 有意한 抑制 效果를 알 수 있었다.(Table 15.)

Collagen 誘發 關節炎(CIA) 생쥐에서 腎臟機能의 指標인 血清 creatinine의 變化를 살펴보기 위해 48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析機(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다. creatinine은 DBA/1J 정상생쥐보다 CIA 생쥐인 對照群에서 33.3%의 增加를 나타내었다. 澤蘭藥鍼群의 creatinine은 對照群에 비하여 6.3%의 抑制 效果가 있었지만 有意한 減少는 나타나지 않았다.(Table 16.)

Collagen 誘發 關節炎(CIA) 생쥐에서 炎症作用의 指標인 血清 LDH의 變化를 살펴보기 위해 48日째 實驗 終了 후 血清을 分離하여 自動血清分析機(550 express, CIBA-CORNING)로 測定하였다. LDH는DBA/1J 정상생쥐보다 CIA 생쥐인 對照群에서 364.9%의 增加를 나타내었다. 澤蘭藥鍼群의 LDH는 對照群에 비하여 47.8%의 有意한 抑制 效果가 있었다.(Table 17.)

澤蘭藥鍼液에 의한 脾臟細胞의 活性化를 살펴보기 위해 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 7日

동안 PWM, 澤蘭藥鍼液과 同時培養(coculture)한 후 脾臟細胞의 形態의인 變化를 inverted 顯微鏡(×400)으로 觀察하였다. 그 結果 對照群은 附着細胞들이 若干의 活性化가 보였고, PWM處理群은 浮游細胞의 活性化를 나타냈다. 澤蘭藥鍼液處理한 후 4日째에는 浮游細胞의 減少와 附着細胞의 活性化가 對照群에 비하여 增加되었고 7日째에는 浮游細胞의 急激한 減少와 附着細胞의 顯著한 活性化가 對照群에 비하여 크게 增加되었다.(Fig. 18)

流細胞 螢光分析器를 利用하여 脾臟細胞內의 IL-12 遺傳子 發現의 觀察에서 IL-12는 dendritic 細胞와 phagocytes에서 分泌되어 NK細胞와 T細胞(Th1) 分化에 重要한 役割을 하고 IFN- γ 의 生成을 誘導한다^{65,127)}.

脾臟細胞에서 澤蘭藥鍼液에 의한 IL-12 遺傳子 發現은 對照群에 비하여 10, 50 및 100 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液處理群에서 各各 163, 169.6, 89.1%로 IL-12 遺傳子 發現이 增加하였다.(Table 19, Fig. 19)

脾臟細胞內의 IFN- γ 遺傳子 發現의 觀察에서 IFN- γ 는 外部侵入者와 後天性 免疫 등에 대한 宿株의 防禦에 中心的 役割을 가진다^{65,127,128)}. IFN- γ 는 T 細胞와 NK 細胞로부터 分泌되고, IL-12에 의하여 生成이 誘導된다는 主張과 IL-2, TNF, IL-1에 의하여 NK細胞에서 誘導된다고 主張하고 있다^{65,127,128)}. 本 研究結果로 脾臟細胞에서 澤蘭藥鍼液에 의한 IFN- γ 遺傳子 發現은 對照群에 비하여 10, 50 및 100 μ g/ml 濃度の 澤蘭藥鍼液處理群에서 各各 25.6, 174.4, 153.5%의 IFN- γ 遺傳子 發現이 增加하였다.(Table 20, Fig. 20)

脾臟細胞 培養에 대한 免疫細胞의 變化를 살펴보기 위해 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 48時間 동안 LPS, 澤蘭藥鍼液 등을 處理한 후 脾臟 免疫細胞를 anti-CD3e, anti-CD4, anti-CD8 그리고 anti-CD19를 利用하여 流細胞 螢光分析器로 測定하였다.

CD4⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果, 培養된 脾臟細胞內의 CD4⁺細胞數가 LPS處理群은 對照群에 비하여 15.0% 增加하였으나, 澤蘭藥鍼液處理

群은 對照群에 비하여 25.5%의 免疫細胞 減少가 觀察되었다.(Table 21, Fig. 21)

CD8⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果, 培養된 脾臟細胞內의 CD8⁺細胞數가 LPS處理群은 對照群에 비하여 9.3% 減少로 큰 影響은 없었고, 澤蘭藥鍼液處理群은 對照群에 비하여 43.8%로 免疫細胞의 顯著的 減少가 觀察되었다.(Table 22, Fig. 22)

CD19⁺細胞數의 變化를 觀察한 結果, 培養된 脾臟細胞內의 CD19⁺細胞數가 LPS處理群은 對照群에 비하여 33.2% 減少하였고, 澤蘭藥鍼液處理群은 對照群에 비하여 41.0%로 顯著的 免疫細胞 減少가 觀察되었다.(Table 23, Fig. 23)

이것으로 보아 CD4⁺, CD8⁺ 및 CD 19⁺ 各各의 免疫細胞 減少로 볼 때 澤蘭藥鍼液이 直接的인 細胞毒性이 있을 것으로 推論된다.

以上을 綜合하여 볼 때 澤蘭藥鍼液은 滑膜細胞에서 發現되는 IL-6, IL-1 β , TNF- α 遺傳子 發現을 抑制함으로써 滑膜細胞의 增殖 抑制와 關聯이 있었으며, Collagen II 誘發 關節炎 DBA/1J 생쥐에서 足三里에 澤蘭藥鍼이 關節炎을 抑制하는 것을 觀察할 수 있었으며, 正常 BALB/C 생쥐의 脾臟細胞에 澤蘭藥鍼液을 處理하여 IL-12, IFN- γ 遺傳子 發現을 增加시켰다. 이는 澤蘭藥鍼이 關節炎 治療에 有效한 것을 立證한 것으로, 向後 臨床에서 많이 活用할 수 있을 것으로 期待된다.

V. 結 論

關節炎에 대한 澤蘭藥鍼의 效果를 觀察하기 위하여, 人體의 滑膜細胞, Collagen II 關節炎 DBA/1J 생쥐 및 正常 BALB/c 생쥐를 對象으로 澤蘭藥鍼液處理 및 澤蘭藥鍼하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 澤蘭藥鍼液에 의한 滑膜細胞에 대한 細胞毒性에서 1, 10, 50 및 100 μ g/ml 에서는 有意한 變化가 없었고, 200 및 400 μ g/ml에서는

有意한 減少가 있었다.

2. 滑膜細胞의 IL-6, IL-1 β , TNF- α 遺傳子 發現과 IL-6, IL-1 β 分泌量은 澤蘭藥鍼液處理群에서 顯著히 抑制되었다.
3. rIL-6과 澤蘭藥鍼液 200 및 100 μ g/ml 並行處理群에서는 滑膜細胞의 增殖이 有意하게 抑制되었다.
4. 澤蘭藥鍼은 Collagen II 關節炎 DBA/1J 생쥐의 關節炎 發病率, 뒷다리 浮腫, 關節炎 指標, 遲延型 過敏反應 등을 有意하게 抑制하였다.
5. 澤蘭藥鍼은 Collagen II 關節炎 DBA/1J 생쥐에서 脾臟 무게는 有意한 增加, 白血球數는 有意하게 減少시켰고, 血小板數는 有意한 變化가 없었다.
6. 澤蘭藥鍼은 Collagen II 關節炎 DBA/1J 생쥐에서 CD4⁺, CD8⁺ 活性細胞數와 表面受容體 發現이 增加하였고, CD19⁺ 活性細胞數와 表面受容體 發現이 減少하였다.
7. 澤蘭藥鍼은 Collagen II 關節炎 DBA/1J 생쥐에서 total protein, LDH는 有意하게 減少시켰고, creatinine은 有意한 變化가 없었다.
8. 正常 BALB/C 생쥐 脾臟細胞에 澤蘭藥鍼液을 處理하여 培養한 結果, 附着細胞들이 形態의 으로 活性化됨을 觀察하였고, IL-12 및 IFN- γ 의 遺傳子 發現이 增加하였다.
9. 正常 BALB/C 생쥐 脾臟細胞에 澤蘭藥鍼液을 處理하여 培養한 結果, 對照群에 비하여 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 活性細胞數와 表面受容體 發現을 抑制시켰다.

以上을 綜合하여 볼 때 澤蘭藥鍼이 關節炎 治療에 有效한 것으로 나타나, 向後 臨床에서 그 活用在 期待된다.

參 考 文 獻

1. 崔述貴 編著 : 實用鍼灸內科學, 서울, 醫聖堂, pp.405~412, 584~590, 1993.

2. 黃文東 外：實用中醫內科學，上海，上海科學技術出版社，pp.554~569, 1986.
3. 권재식, 김기현, 김형태, 박응호, 서성훈 편저:痺證, 서울, 정담, p.207, 208, 214, 215, 270, pp.219~222, 1993.
4. 白洪龍:常見病症辨症診治概要,雲南省,雲南人民衛生出版社,pp.382~385, 1984.
5. 金必宜:歷節風에 應用된 鍼灸治療에 關한 文獻的 考察,大田大學校大,碩士學位論文, 1992.
6. 權度希, 催道永:木通藥鍼刺戟이 痛風誘發 원취에 미치는 影響,大韓鍼灸學會誌, 14(2):173~189, 1997.
7. 나창수, 김정상, 권우섭, 황우준:원취의 關節炎에 미치는 熊膽·牛黃 藥鍼과 豬膽·牛黃 藥鍼의 效能比較(副題:豬膽의 效能科明을 통한 治療藥劑 및 治療法 開發),大韓鍼灸學會誌, 16(1):553~547, 1999.
8. 이준무, 김경식:足三里, 二陵穴의 膝關節炎에 대한 臨床的 效果,韓醫學 學術大會論文抄錄集, p.101, 102, 1982.
9. 李東寧, 崔翊善:膝關節疾患의 鍼灸治療穴에 對한 文獻的 考察,大韓鍼灸學會誌, 3:53~59, 1986.
10. 鄭魁山 編:鍼灸集錦,甘肅省,甘肅科學技術出版社, p.54, 55, 1988.
11. 中醫研究院 編:鍼灸學簡編,北京,人民衛生出版社, p.373, 374, 1989.
12. 崔容泰 外:鍼灸學(上,下),서울,集文堂, p.1272, 1457, pp.382~384, 1297, 1298, 1988.
13. 崔容泰 外:精解鍼灸學,서울,杏林書院, p.184, 248, pp.166~174, 279~282, 615~617, 1974.
14. 上海中醫學院:新編中醫學教材(鍼灸學),香港,商務印書館, p.89, 90, pp.211~216, 333~335, 1982.
15. 安榮基:經穴學叢書,서울,成輔社, p.196, 197, 1986.
16. 金薰:薏苡仁 分劃藥鍼이 Adjuvant關節炎에 미치는 影響,大田大學校 碩士學位論文, 1997.
17. 李妍炅:斑猫藥鍼이 白鼠의 Adjuvant關節炎에 미치는 影響,大田大學校 碩士學位論文, 1996.
18. 全國韓醫科大學本草學教室:本草學,서울,永林社, p.433, 434, 1995.
19. 孫星衍·孫馮翼輯,神農本草經(卷二),臺北,五州出版社, p.18, 1985.
20. 鄭普燮 辛民教 共編:鄉藥(生藥)大辭典,서울,永林社, p.850, 1990.
21. 劉文泰·等勅撰:本草品彙精要,北京,人民衛生出版社, p.331, 332, 1982.
22. 汪昂:本草備要,서울,高文社, p.45, 46, 1984.
23. 李時珍 原著·余瀛繁 林青 編:本草綱目(精華本),北京,科學出版社, p.45, 46, 1998.
24. 朴允熹, 鄭錫熙, 李鍾秀, 金性洙, 申鉉大:류마티스性 關節炎에 대한 治療2例,大韓韓醫學會誌, 9(2):71~75, 1988.
25. 責編組:中藥四海,北京,中國醫藥科技出版社, pp.1074~1077, 1993.
26. 李潤浩, 朴東錫, 金正坤:鍼·灸 및 秦朮水鍼이 원취의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響,大韓韓醫學會誌, 10(1):125~131, 1989.
27. 金甲成, 姜成吉:草龍膽水鍼에 依한 肝機能改善이 膝關節炎症性 浮腫에 미치는 影響,慶熙韓醫大論文集, 10:127~149, 1987.
28. 康秀一, 崔容泰:穴位別 草烏水鍼刺戟이 원취의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響,慶熙韓醫大論文集, 13:203~217, 1990.
29. 宋彥錫, 安秉哲, 朴東錫:加味疎風活血湯水鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響,大韓鍼灸學會誌, 7(1):19~37, 1990.
30. 李昊根, 鄭錫熙, 金成洙:大羌活湯이 第Ⅱ型 Collagen 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響,東醫物理療法科學會誌, 4(1):87~99, 1994.
31. 申炳熙, 李鍾秀, 申鉉大:桂枝芍藥知母湯이 第Ⅱ型 Collagen 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響,東醫物理療法科學會誌, 4(1):121~131, 1994.

32. 嚴載元, 鄭錫熙, 李鍾洙, 金性洙, 申鉉大: 骨擔草가 第II型 Collagen 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響, 東醫物理療法學會誌, 5(1):149~161, 1995.
33. 김성재, 이언정, 김형근, 송봉근 : 秦芫가 collagen 誘發 關節炎의 免役反應에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 19(1):368~384, 1998.
34. Firestein, G. S., Ethology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In Textbook of rheumatology. 5th ed.W.N.Kelly, E.d.Harris,Jr.,S Ruddy, and C.B.Sledge, editors. W.B. Saunders. Philadelphia,PA. 851~897, 1996.
35. Morland, L. W., et al., Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. N. Engle.J.Med. 337:141~147, 1997.
36. Firestein, G. S., Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: passive responders or transformed aggressors? Arthritis Rheum. 39:1781~1790, 1996.
37. Roivainen, A.,et al., H-ras oncogen point mutation is arthritic synovium. Arthritis Rheum.40:1636~1643, 1998.
38. Firestein, G. S., Echeverri, F., Yeo,M., Zcaufler,N.J., and Green, D.R., Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94.10895~10900, 1997.
39. Reme,T., et al., Mutations of the p53 tumor suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue. Clin. Exp. Immunol. 111:353~358, 1998.
40. Fassbender, H.G., and Gray, S., Synovial processes in rheumatoid arthritis. Scand.J. Rheumatol. 76(Suppl.):1~7, 1988.
41. Cronstein, B.N., and Weissmann, G., Tumor necrosis factor and leukocyte adhesion molecules of inflammation. Arthritis Rheum. 36:147~157, 1993.
42. Steven, C.R., Blake, D.R., Merry,P., Revell, P.A., and Levick, J.R., A comparative study by morphogenetic synovium. Arthritis Rheum. 34:1508~1513, 1991.
43. Koch, A. E., Angiogenesis:implications for rheumatoid arthritis [review]. Arthritis Rheum. 41: 951~962, 1998.
44. Taylor, P. C., et al., Reduced synovial vascularity following TNF- α blockade in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 41(Suppl.):S295, 1998.
45. Walsh, D. A., Wade. M., Napp, P. I/ and Blake, D.R., Ficcally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. Am. J. Pathol. 152:691~702, 1998.
46. Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheres, A. F., Requirement of cascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science. 264:569~571, 1994.
47. Papazissi, K., Geromichalos. D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H.: Optimization of the sulforhodamine B(SRB) Colormetric assay, J. Immunological method. 208, pp.151~158, 1997.
48. Firestein, G. S., Yeo, M., and Zcaifler, N.J., Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. J. Clin Invest. 96:1631~1638, 1995.
49. Peacock, D. J., Banquerigo, M.L., and Brahn, E., Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. J.Exp. Med.175:1135~1138, 1992.
50. DeGraw. J.I.; Colwell, W. T; Smith, R. L; Piper, J. R; Waud, W; Sirotnat, F. M. Analogues of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. 1. Effects of 10 Deazaaminopterrin Analogues on Type collagen Induced Arthritis in Mice. J. Med. Chem., 40, 370~

- 376, 1997.
51. DeGraw, J. I; Christie, P. H.; Brown, E. G.; Kelly, L. F.; Kisliuk, R. L.; Gaumont, Y.; Sirotnak, F. M. Synthesis and Antifolate Properties of 10-Alkyl-8, 10-dipeazaaminopyrimidines. *J. Med. Chem.*, 27, 376~380, 1984.
52. Temple, C., Jr.; Elliott, R. D.; Montgomery, J. A. Pyrido [2,3-d] pyrimidines. Synthesis of the 5-Deaza Analogues of Aminopterin, Methotrexate, Folic Acid, and N10-methylfolic Acid. *J. Org. Chem.*, 47, 761~764, 1982.
53. Taylor, E. C.; Palmer, D.C.; George, T.J.; Fletcher, S. R.; Tseng, C. P.; Harrington, P.J; Beardsley, G. P. Synthesis and Biological Activity of L-5-Deazaaminopterin: Synthetic Strategies to 5-Deazapteridines. *J. Org. Chem.*, 48, 4852~4860, 1983.
54. Piper, J. R.; McCaleb, G. S.; Montgomery, J. A.; Kisliuk, R. L.; Gaumont, Y.; Sirotnak, F. M. Synthesis and Antifolate Activity of 5-Methyl-5-deaza Analogues of Aminopterin, Methotrexate, Folic Acid, and N10-Methylfolic Acid. *J. Med. Chem.*, 29, 1080~1087, 1986.
55. Piper, J. R.; McCaleb, G. S.; Montgomery, J. A.; Kisliuk, R. L.; Gaumont, Y.; Sirotnak, F. M. 10-Propargylaminopterin and Alkyl Homologous of Methotrexate as Inhibitors of Folate Metabolism. *J. Med. Chem.*, 25, 877~880, 1982.
56. Arsenault, A. L., Lhotak, S., Hunter, W.L., Banquerigo, M.L., and Brahn, E., Taxol involution of collagen-induced arthritis: ultrastructural correlation of synovitis and neovascularization. *Clin Immunol. Immunopathol.* 86:280~289, 1998.
57. Storgard, C. M., et al., Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha v/\beta 3$ antagonist. *J. Clin. Invest.* 103:47~54, 1999.
58. Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., and Hynes, R.O., Extensive vasculogenesis, and organogenesis proceed lethality in mice lacking all αv integrins. *Cell.* 95:507~519, 1998.
59. Daniel, W.W. ; A foundation for analysis in the health sciences, third edition, p.136~146, 1983.
60. 金寅相 : 整形外科Rehabilitation, 서울, 中社, p.7, 8, 1988.
61. 李文鎬 外 : 內科學(下), 서울, 學林社, pp.1693~1702, 1979.
62. 大韓整形外科學會 : 整形外科學, 서울, 최신의학사, pp.109~131, 1992.
63. 吉利和 編著 : 內科診斷學(改訂6版), 서울, 第一醫學社, p.176, 668, 669, 1994.
64. 木村邦夫·김태요, 이강창 譯 : 증례로 배우는 통증치료, 서울, 군자출판사, p.121, 122, 1996.
65. 서울대학교 의과대학편 : 면역학, 서울, 서울대학교출판부, p.266, 271, pp.1~27, 121~130, 251~256, 1986.
66. Robbins L.Stanley : Pathologic basis of disease W.B. Saunders Co. philadelphia 1984.
67. James.B. Wyngaarden : Cecil Textbook of Medicine, Philadelphia, WA Souders company, pp.1508~1515, 1992.
68. 김성윤 : 류마티스관절염의 진단과 치료, 서울, 家庭醫學會誌, 35(1):51~57, 1992.
69. 김성윤 : 류마티스관절염의 내과적 치료, 서울, 大韓醫學協會誌, 35(10): 1223~1229, 1992.
70. 김재생 外 : 류머티스양 관절염환자에서 Recombinant interferon -gamma의 임상응용, 서울, 大韓醫學協會誌, 32(12):1331~1335, 1989.

71. 김종운 : 약물요법, 서울, 서울대학교출판사, pp.305~311, 1992.
72. 김동휘 외 : 최신진단과 치료, 서울, 약업신문사, pp.634~637, 1992.
73. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, p.366, 369, 1984.
74. 巢元方 : 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, pp.5~8, 1982.
75. 王焘 : 外臺秘要方, 서울, 大星文化社, p.424, 1983.
76. 李梴 : 編註醫學入門, 서울, 大星文化社, p. 523, pp.369~371, 1989.
77. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.370~378, 1987.
78. 張介賓 : 景岳全書, 北京, 人民衛生出版社, pp.248~255, 1991.
79. 李用粹 : 證治彙補, 台北, 旋風出版社, pp.19 8~206, 1976.
80. 程國彭 : 醫學心悟, 香港, 友聯出版社, pp.17 1~174, 1961.
81. 虞搏 : 醫學正傳, , 北京, 人民衛生出版社, p.212~218, 1981.
82. 龔廷賢 : 萬病回春, 北京, 人民衛生出版社, p. 309, 1972.
83. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, pp.480~481, 1983.
84. 高武 : 鍼灸聚英, 上海, 上海科學技術出版社, p.32, 33, p.175, 1978.
85. 唐容川 : 血證論, 台北, 力行書局有限公司, p.168, 1984.
86. 王清任 : 醫林改錯, 台北, 台聯國風出版社, p.65, 1975.
87. 劉鵬舉, 孫校, 夏洪生 主編 : 中醫臨證指南, 長春, 吉林科學技術出版社, pp.203~205, 1991.
88. 原安徽中醫學院編 : 中醫臨床手冊, 서울, 成輔社, p.124, 125, 1983.
89. 楊維傑 編著 : 黃帝內經素問譯解, 台北市, 台聯國風出版社, p.95, 96, pp.328~336, 1984.
90. 高敬錫 : 人蔘水鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 영향, 慶熙大學校 博士學位論文, 1988.
91. 金大洙 : 三種의 製法에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 영향, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1989.
92. 黃慶愛 : 人蔘 및 鹿茸水鍼이 時間經過에 따른 免疫效果研究, 慶熙大學校 博士學位論文, 1988.
93. 金卿顯 : 人蔘 및 鹿茸水鍼이 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1988.
94. 盧宗植 : 鹿茸, 人蔘, 甘草水鍼이 糖尿病에 대한 效果 및 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1988.
95. 黃珥絃 : 濃度別 當歸藥鍼이 放射線 被爆에 의한 免疫機能低下에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):113~129, 1994.
96. 裴元永 外 : 黃芪水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):49~66, 1994.
97. 朴鎮雄 外 : 濃度差에 따른 黃芪藥鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):67~81, 1994.
98. 宋允喜 : 溫鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1990.
99. 周泰靑 : 溫鍼이 寒冷에 노출된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1992.
100. 劉泰成 : Laser鍼이 糖尿病白鼠의 血清 및 細胞性 免疫에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1989.
101. 李相範 : 艾灸가 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1992.
102. 高炳熙 : 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK細胞活性度에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1986.
103. 朴快煥 : 當歸水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影

- 響에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 7:261~271, 1984.
104. 姜成吉 : 大戟水鍼이 鎮痛 및 水銀中毒에 미치는 영향에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 5:1~18, 1982.
105. 高敬錫 : 理中湯水鍼이 鎮痛 抗瀉下 및 Uropepsin值에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 5:62~71, 1984.
106. 金榮振 : 鹿茸水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 4(1):49~74, 1987.
107. 朴英培 : Mouse의 鎮痛效果에 미치는 影響에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 3:199~203, 1980.
108. 宋春浩 : 丹參水鍼이 鎮痛 및 血壓降下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 8:205~217, 1985.
109. 李弼雄 : 人蔘水鍼이 鎮痛 및 血壓에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1984.
110. 李種國 : 防風水鍼이 鎮痛, 消炎, 解熱 및 鎮痙에 미치는 영향, 大韓鍼灸學會誌, 18(1):11~23, 1986.
111. 金甲成 : 草龍膽 水鍼에 의한 肝氣能改善이 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1987.
112. 林사비나 : 3-methylcholanthrene 皮膚癌에 대한 刺戟部位別 抗癌 및 免疫增強效果, 慶熙大學校 博士學位論文, 1993.
113. 朴快煥 : 天麻水鍼이 抗痙攣效果에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1988.
114. 金甲麗 外 : 鹿茸水鍼이 白鼠의 副腎皮質機能不全에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 4:49~62, 1987.
115. 金在煜 : 人蔘水鍼이 endotoxin으로 誘發된 血栓動物模型에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 13:219~233, 1990.
116. 金在圭 : Ethanol中毒에 대한 鍼, 灸 및 人蔘水鍼이 解毒效果에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1985.
117. 金洋植 : 防風水鍼이 環 쥐의 氣管上皮細胞에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 碩士學位論文, 1984.
118. 李惠貞 : Alloxan 糖尿病家兔에 對한 人蔘水鍼의 效果 및 Horseradish Peroxidase의 軸突逆輸性에 관한 研究, 慶熙大學校 博士學位論文, 1986.
119. 越昌剛 : 麝香注射液治療腰扭傷, 新中醫, 4:26, 1983.
120. 潘毓嵩 : 穴位注射治療肩周圍炎20例介紹, 新中醫, 8:18, 1983.
121. 王左, 潘維明 等 : “芍藥”等“金廷”注射液治療痛症520例 及 其止痛效果深討, 上海中醫藥雜誌, p.14, 1983.
122. 張柱寶 : 麝香精注射液治療老年脾腎陽虛泄瀉, 中醫雜誌, 3:30~31, 1983.
123. 巫善明, 張孝秩 等 : 蔘三七注射液治療血瘀形慢性肝炎及血液流變學初步觀察, 上海中醫藥雜誌, 8:12~13, 1983.
124. 范華昌 : 蔘三七注射液治療上消化道出血110例, 上海中醫藥雜誌, 9:15~16, 1983.
125. 丁瑞川 : 紅花萆薢注射液治療濕疹例, 上海中醫藥雜誌, 1:15, 1983.
126. 張冠生, 王昌德 : 下鼻甲粘膜炎注射丹蔘液治療過敏性鼻炎, 中醫雜誌, 9:18~19, 1984.
127. 타다토미오지·황상익 譯 : 면역의 의미론, 하늘과학문고, p.79, 81, pp.86~87, 1998.
128. 中島 泉·吳贊鎬 譯 : 新免疫學入門, 支溝문화사, p.67, 176, 177, pp.123~128, 1986.
129. 김세중 : 免疫學, 서울, 高麗醫學, pp.148~150, 1994.
130. 하대유 : 면역학, 서울, 高麗醫學, p.242, 404, 408, 409, 1994.
131. Bruce albert et al. : Molecular biology of the cell(3rd edition), Garland Publilshing, New york, pp.1195~1197, 1994.