

원저

桂枝藥鍼刺戟이 mouse의 LPS誘發 關節炎 中 細胞性免疫反應에 미치는 影響

최유행 · 김갑성 · 이승덕

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Ramulus Cinnamomum Aqua-acupuncture on The Cellular Immune Responses to LPS Induced Arthritis in Mice

Cho, Yoo-Haeng · Kim, Kap-Sung · Lee, Seung-Deok

Department of Acupuncture & Moxibustion, college of Oriental Medicine
Dong-Guk University

Objective : The purpose of this study is to investigate the immunological effect of Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture on the cellular immune response in mice with LPS induced arthritis.

Methods : All the BALB/C mice used in this study were bred and maintained in our pathogen-free mouse colony and were 6wk of age at the start of the experiment. The experimental model of arthritis was induced by injection of 300 μ g/kg LPS in mice knee joint. Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture was injected into Yangnungchon(Gb34) of mice 2daily for 14days. Immunohistochemical analysis was carried out to assess CD4+, CD8+, CD11b, IL-1 β , IL-2R and CD106 expression in common iliac lymph nodes and synovial membrane after stimulation with Ramulus Cinnamomum. Electron microscopy was carried out to assess change of synovial membrane. Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation group was compared to control group and non stimulated with aqua-acupuncture.

Results : At day 14 post arthritis onset, Immunohistological studies using monoclonal antibodies showed that Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture group had decreased expression of CD4+, CD8+, CD11b, IL-1 β , IL-2R and CD106 at common iliac lymph nodes and synovial membrane compared with control group.

Conclusions : Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation inhibited the development of cellular immunity to LPS-induced arthritis in mice. Thus, aqua-acupuncture stimulation may have preventive

· 접수 : 1월 7일 · 수정 : 1월 14일 · 채택 : 1월 17일

· 교신저자 : 김갑성, 경북 경주시 용강동 357, 동국대 경주한방병원 침구과(Tel. 054-770-1558)

E-mail : kapsung@unitel.co.kr

effects on autoimmune inflammatory joint diseases. The effects of AA on immune function and disease activity in patients with RA warrant further investigation.

Key words : Rheumatoid arthritis, Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture, cellular immunity, T lymphocyte, cell adhesion molecule, IL-1 β , IL-2 receptor.

I. 서론

류마티스關節炎(Rheumatoid Arthritis, R.A.)은四肢의關節을侵犯하는疾病으로서 그중에서도손가락關節에 잘侵犯되어關節軟骨을破壞하고滑膜에炎症을 일으키는自家免疫疾患(autoimmune disease)이다²²⁾.

류마티스關節炎이自家免疫疾患으로 생각되고 있는 주된 이유는自家抗體가患者의血液과關節에 존재하며患者의關節組織에서局所免疫反應의特徵을 보이는단핵구세포의浸潤과炎症을 보이는滑膜에서CD4陽性T세포, 활성화된B淋巴球, plasma 세포 및大食세포(macrophage)등이 발견되며滑液內에서 이들 활성화된淋巴球나大食세포들이분비한 다양한cytokine들이 발견되기 때문이다¹²⁾.

韓醫學에서痺證은風寒濕의邪氣가肢體와關節을侵犯하여疼痛,麻木,重着,關節腫大,屈伸不利 및活動障礙를 일으키는疾患으로³¹⁾ 이는 서양의학적病名인류마티스關節炎과類似한臨床證候을 보이며³³⁾, 치료에 있어서祛風除濕,活血化瘀,通經活絡하는藥物이 많이 사용되고 있다⁹⁾.

關節炎에對한藥鍼효과에 관한報告로는, 김 등^{7),10),21)}이LPS誘發關節炎에서藥鍼刺戟이cyt-
okine에 미치는 효과를,嚴 등¹⁷⁾,李 등²⁵⁾ 및申 등¹⁵⁾이第Ⅱ型collagen誘發關節炎에서藥鍼刺戟이

抗體에 미치는 영향,申 등^{14),32)}은藥鍼刺戟이ad-
juvant誘發關節炎에對하여消炎,鎮痛 및解熱 등의 효과를,劉等²³⁾이關節炎患者에게溫鍼 및藥鍼刺戟을 하여末梢血液의NK cell과IL-2의活性도가低下되었는報告 등이 있으며, 특히Zhu 등⁴⁵⁾은류마티스關節炎患者 82名에게艾灸를施行하여ESR이減少하고, RA factor가陰性으로 바뀌었으며, hemoglobin과E-rosett形成이 증가하였다고報告하였으나桂枝藥鍼을使用하여細胞性免疫反應을觀察한研究報告는 없었다.

이에著者はLPS로 생쥐에關節炎을 유발시킨 후,經脈을溫通시키는作用이 있어寒濕痺 등의證을 다스리는桂枝(Ramulus Cinnamomum)를藥鍼으로 만들어陽陵泉(Gb34)을刺戟하여CD4陽性T淋巴球, CD8陽性T淋巴球, macrophage, VCAM-1, Interleukin-1 β (IL-1 β) 및IL-2R에對한細胞性免疫反應의變化를觀察하여有意한結果를 얻었기에報告하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 動物

대령 4週된 BALB/C系 암컷 mouse (大韓實驗動物센터)를 22 \pm 2 $^{\circ}$ C 溫도와 55~60%濕도가維持되는條件으로, 感染을防止하고자無菌飼育裝置內에서 2週日동안適應시킨 후, 體重 30g 內외의 것을

選別하여 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 使用한 桂枝藥鍼은 東國大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 精選한 桂枝(Ramulus Cinnamomum)를 다음과 같은 水蒸氣蒸溜冷却式 藥鍼液 調製法에 依據하여 藥鍼粉末을 調製하여 實驗에 使用하였다.

3) 藥鍼의 製造

桂枝를 수증기 증류냉각식 약침액 조제법²⁾에 의거하여 藥鍼 粉末을 조제하였다. 우선 반응조에 깨끗이 씻은 桂枝 300g과 증류수를 넣어 끓인다. 이때 桂枝가 증류수의 위로 10mm 정도 떠 있도록 증류수의 양을 조절한다.

반응조 안의 약재와 증류수가 끓으면서 발생한 수증기를 냉각관에 거치게 하면 증류된 약액이 되는데, 이것을 모아 0.8 μ m, 0.45 μ m, 0.2 μ m짜리 여과

막(Membrane Filter)에 순서대로 3회 여과시킨다.

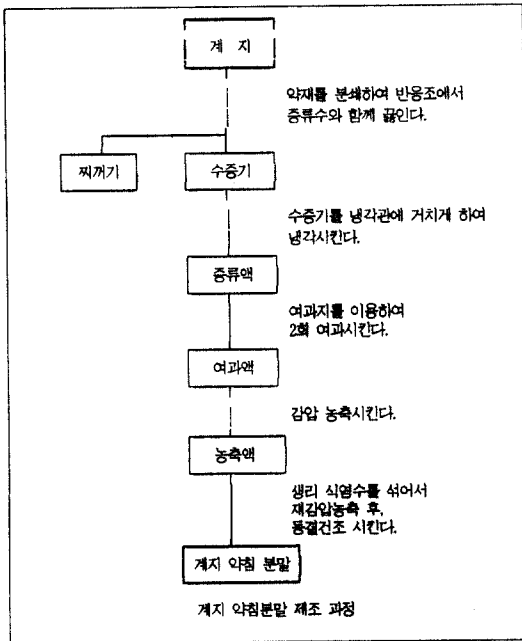
여과된 약액을 감압 농축시키고, 농축된 약액에 생리식염수를 섞어서 재감압 농축시킨다. 이렇게 만들어진 농축액을 3일간 凍結乾燥시키고, 완전히 건조가 되면 믹서기를 이용 곱게 분쇄하여 밀봉 보관한다(scheme 1).

4) 試藥 및 機器

Lipopolysaccharide(LPS; E.coli 055:B5), sodium pentobarbital solution, EDTA solution, paraaffin, 0.0125% 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 0. M is-HCl 완충용액(pH7.4)은 Sigma社(U.S.A.)로부터, paraformaldehyde는 EMS社(U.S.A.)로부터, rat anti-mouse CD4(L3T4), rat anti-mouse CD Ly2), avidin bition complex (ABC)는 Vector stain社(U.S.A.)로부터, Weigert's iron hematoxylin, Van Gieson's stain solution은 Fluka社(Germany)로부터, aldehyde fuchsin, methyl orange solution, Wright's stain, Giemsa stain은 BDH社(England)로부터, normal goat serum, biotinylated goat anti-rat IgG, biotinylated goat anti-mouse는 DAKO社(Denmark)로부터, rat anti-mouse CD11b, rat anti-mouse IL-1 β , rat anti-mouse IL-2R, rat anti-mouse CD106은 Serotec社(England), 0.05% pepsin이 포함된 0.01N HCl 용액(pH2.0)과, 0.01% hydrogen peroxide은 Junsei社(Japan)로부터 購入하여 使用하였다.

實驗에 使用한 機器는 hemacytometer (Superior, Germany), 光學顯微鏡(BH2, Olympus, Japan) 및 透過電子顯微鏡(Hitachi H-600, Japan) 등이었다.

Scheme 1.



2. 方法

1) 取穴

생쥐의 經穴은 人體와 달리 그 部位가 曖昧하여

解剖學的으로 人體의 陽陵泉(Yangnungchon: Gb₃₄)에 相應하는 部位의 鬚를 除去한 후 骨度分寸法으로 取穴하였다.

2) 關節炎 誘發

關節炎은 sodium pentobabital solution으로 麻酔한 후 무릎부위 皮膚를 切開하여 무릎 뼈를 확인한 후 lipopolysaccharide(LPS; E.coli 055:B5)를 蒸溜水에 稀釋한 후 各各 300 μ g/kg씩 무릎 關節에 注射하여 誘發시켰다.

3) 藥鍼刺戟

桂枝藥鍼刺戟群에는 製造된 桂枝藥鍼粉末 0.03g을 生理食鹽水 10ml에 溶解시켜서, 1.0ml 注射器(26gauge, 綠十字醫療工業(株), 그린젝트-1)를 利用하여, LPS處置 第2日후부터 2日間隔으로 陽陵泉에 100 μ l씩 總 6回 刺戟하였다.

4) 實驗群의 分類 및 處置

實驗動物은 생쥐 7마리를 1群으로하여 處置하지 않은 正常群(Normal), LPS로 關節炎을 誘發시킨 關節炎誘發群(Control), LPS注射 第2日후부터 2日間隔으로 桂枝藥鍼을 刺戟한 桂枝藥鍼刺戟群(Sample)으로 分類하였으며, 時間의 經過에 따라 第3, 7 및 第14日로 分類하였다.

5) 무릎 關節의 脫灰와 標本製作

關節炎誘發群과 藥鍼刺戟群에 LPS注射후 第3, 7 및 14日 經過 후 sodium pentobabital solution으로 麻酔한 다음 4% paraformaldehyde로 心臟貫流 固定을 施行하고, 무릎 關節을 摘出하여 24時間 동안 4% paraformaldehyde에서 再固定한 후 4週 동안 EDTA solution에서 decalcification한 후 蒸溜水로 洗滌하였다.

그런 다음 洗滌된 무릎 關節을 通常의인 方法으

로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 連續切片을 만들어, hematoxyline과 eosin으로 染色하여 標本을 製作하였다.

6) 온영덩淋巴節內的 CD4와 CD8(TH와 TC C-cell)의 分布變化 觀察

온영덩淋巴節(Common iliac lymph node)內的 CD4 T 淋巴球(helper T cell)와 CD8 T 淋巴球(cytotoxic T cell)의 分布變化를 觀察하기 위하여 5 μ m의 連續切片에 免疫組織化學的 染色을 實施하였다. 切片을 0.05% pepsin이 包含된 0.01N HCl 溶液(pH2.0)에 5分 동안의 proteolysis過程을 거친 후 切片을 1:500으로 稀釋된 normal goat serum에 30分 동안 反應시킨 후 PBS(phosphate buffer saline)로 水洗하고, 1:100으로 稀釋된 1次 抗體인 rat anti-mouse CD4와 rat anti-mouse CD8에 室溫에서 24時間 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하였다.

그런 다음 1:100으로 稀釋된 2次 抗體인 biotinylated goat anti-rat IgG에 12時間 동안 反應시킨 후 ABC(avidin bition complex)에 30分間 反應시켰다. 0.0125% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.01% hydrogen peroxide가 包含된 0.05M tris-HCl 緩衝溶液(pH7.4)에서 發色시킨 후 he-matoxylin에 對照 染色하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

7) 온영덩淋巴節內的 CD11b(macrophage)의 分布變化 觀察

온영덩淋巴節(Common iliac lymph node)內的 CD11b陽性反應細胞의 分布變化를 觀察하기 위하여 5 μ m의 連續切片에 免疫組織化學的 染色을 實施하였다. 切片을 0.05% pepsin이 包含된 0.01N HCl 溶液(pH2.0)에 5分 동안의 proteolysis過程을 거친 후 切片을 1:500으로 稀釋된 normal goat serum에 30分 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하고, 1:100으로 稀釋된 1次 抗體인 rat anti-mouse CD11b

에 室溫에서 24時間 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하였다.

그런 다음 1:100으로 稀釋된 2次 抗體인 biotinylated goat anti-rat IgG에 12時間 동안 反應시킨 후 ABC(avidin bition complex)에 30分間 反應시켰다. 0.0125% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.01% hydrogen peroxide가 包含된 0.05M tris-HCl 緩衝溶液(pH7.4)에서 發色시킨 후, hematoxylin에 對照染色하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

8) 關節 滑液膜內 IL-1β와 IL-2R의 分布變化 觀察

關節 滑液膜內 IL-1β(interleukin-1β)와 IL-2R(interleukin-2receptor)의 分布變化를 觀察하기 위하여 5μm의 連續切片에 免疫組織化學的 染色을 實施하였다. 切片을 0.05% pepsin이 包含된 0.01N HCl 溶液(pH2.0)에 5分 동안의 proteolysis過程을 거친 후 切片을 1:100으로 稀釋된 normal goat serum에 30分 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하고, 1:100으로 稀釋된 1次 抗體인 rat anti-mouse IL-1β와 rat anti-mouse IL-2R에 室溫에서 24時間 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하였다.

그런 다음 1:100으로 稀釋된 2次 抗體인 biotinylated goat anti-rat IgG에 12時間 동안 反應시킨 후 ABC에 30分間 反應시켰다.

0.0125% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.01% hydrogen peroxide가 包含된 0.05M tris-HCl 緩衝溶液(pH7.4)에서 發色시킨 후, hematoxylin에 對照染色하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

9) 關節 滑液膜內 CD106(VCAM-1)의 分布變化 觀察

關節 滑液膜內 vascular adhesion molecule(VCAM-1)의 變化를 觀察하기 위하여 5μm의 連續切片에 免疫組織化學的 染色을 實施하였다. 切片을

0.05% pepsin이 包含된 0.01N HCl 溶液(pH2.0)에 5分 동안의 proteolysis過程을 거친 후 切片을 1:100으로 稀釋된 normal goat serum에 30分 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하고, 1:100으로 稀釋된 1次 抗體인 rat anti-mouse CD106을 室溫에서 24時間 동안 反應시킨 후 PBS로 水洗하였다.

그런 다음 1:100으로 稀釋된 2次 抗體인 biotinylated goat anti-rat IgG에 12時間 동안 反應시킨 후 ABC에 30分間 反應시켰다.

0.0125% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.01% hydrogen peroxide가 包含된 0.05M tris-HCl 緩衝溶液(pH7.4)에서 發色시킨 후 hematoxylin에 對照染色하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

III. 성적

1. 온영덩淋巴節內的 CD4 陽性 T 淋巴球(helper T cell)의 分布變化

關節炎誘發群에서 CD4 陽性反應을 나타낸 細胞의 數와 反應性이 正常群에 比하여 增加하여 나타났으며, 이러한 變化는 結피질과 수질동에서 觀察되

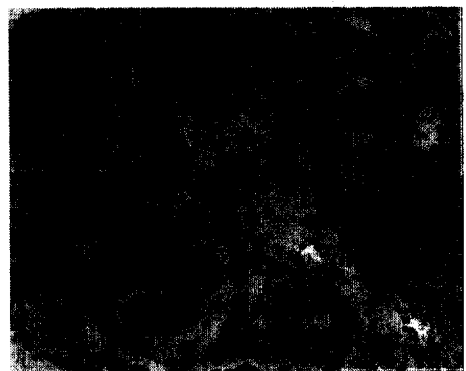


Fig. 1. The distribution of CD 4 positive cell on Common iliac lymph node in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain ×200.

었다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 CD4 陽性反應 細胞가 正常群에 比하여 增加한 樣相으로 나타났으나, 關節炎誘發群에 比하여 CD4 陽性反應細胞數의 減少와 陽性反應性的 弱화가 觀察되었다(Fig. 1.).

2. 온영당淋巴節內的 CD8 陽性 T 淋巴球(cytotoxic T cell)의 分布變化

關節炎誘發群에서 CD8 陽性反應을 나타낸 細胞의 數와 反應性이 正常群에 比하여 增加하여 나타났으며, 이러한 變化는 결피질과 수질동에서 觀察되었다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 CD8 陽性反應 細胞가 正常群에 比하여 增加한 樣相으로 나타났으나, 關節炎誘發群에 比하여 CD8 陽性反應 細胞數의 減少와 陽性反應性的 弱화가 觀察되었다(Fig. 2.).



Fig. 2. The distribution of CD 8 positive cell on Common iliac lymph node in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain $\times 200$.

3. 온영당淋巴節內的 CD11b(macrophage)의 分布變化

關節炎誘發群에서 CD11b 陽性反應을 나타낸 細胞의 數와 反應性이 正常群에 比하여 增加하여 나타났으며, 이러한 變化는 결피질과 수질동에서 觀察

되었다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 CD11b 陽性反應 細胞가 正常群에 比하여 增加한 樣相으로 나타났으나, 關節炎誘發群에 比하여 CD11b 陽性反應 細胞數의 減少와 陽性反應性的 弱화가 觀察되었다(Fig. 3.).



Fig. 3. The distribution of CD 11b positive cell on Common iliac lymph node in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain $\times 200$.

4. 關節 滑液膜內 IL-1 β 의 分布變化

關節炎誘發群에서 IL-1 β 陽性反應이 關節軟骨과 潤滑關節膜 連結部位의 纖維化地域에서 正常群에

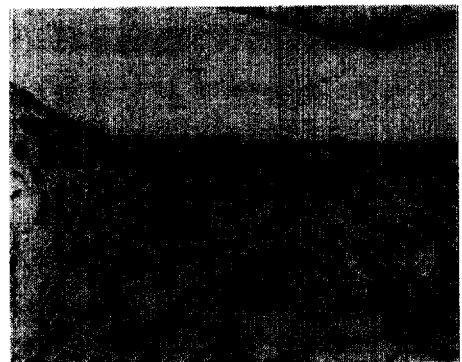


Fig. 4. The distribution of IL-1 β on knee joint in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain $\times 400$.

比하여 현저히 增加된 樣相을 보였다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 IL-1 β 陽性反應 細胞가 正常群에 比하여 增加한 樣相을 보였으나, 關節炎誘發群에 比하여 그 分布가 減少된 것으로 觀察되었다(Fig. 4.).

5. 關節 滑液膜內 IL-2R의 分布變化

關節炎誘發群에서 IL-2R 陽性反應이 潤滑關節膜과 關節滑液膜內의 纖維化가 일어나는 炎症關聯細胞 沈積地域에서 正常群에 比하여 현저히 增加된 樣相을 보였다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 IL-2R 陽性反應 細胞가 正常群에 比하여 增加한 樣相을 보였으나, 關節炎誘發群에 比하여 그 分布가 減少된 것으로 觀察되었다(Fig. 5.).

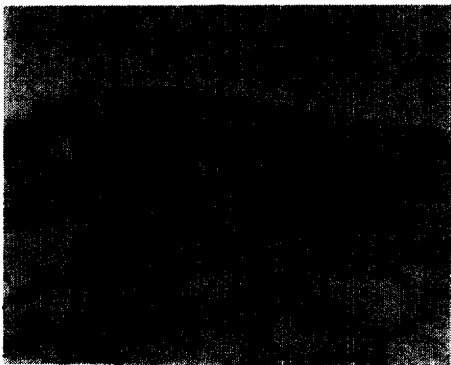


Fig. 5. The distribution of IL-2R on knee joint in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain $\times 400$.

6. 關節 滑液膜內 CD106(VCAM)의 分布變化

關節炎誘發群에서 CD106 陽性反應이 潤滑關節膜과 關節滑液膜內의 纖維化가 일어나는 炎症關聯細胞 沈積地域의 血管周邊에서 正常群에 比하여 현저히 增加된 樣相을 보였다.

桂枝藥鍼刺戟群에서는 CD106 陽性反應 細胞가

正常群에 比하여 增加한 樣相을 보였으나, 關節炎誘發群에 比하여 그 分布가 減少된 것으로 觀察되었다(Fig. 6.).



Fig. 6. The distribution of VCAM on knee joint in mouse at day-14 after LPS injection with Ramulus Cinnamomum aqua-acupuncture stimulation. Immunostain. $\times 400$.

IV. 고찰

류마티스關節炎(Rheumatoid Arthritis, R.A.)은 四肢의 關節을 侵犯하는 疾病으로서 그 중에서도 손가락 關節에 잘 侵犯되어 關節軟骨이 破壞하고 滑膜에 炎症을 主病變으로 하는 自家免疫疾患(autoimmune disease)이다²²⁾.

自家免疫疾患이란 어떤 境遇에 개체 자신의 조직, 세포 또는 그의 분비물의 성분들이 개체 자신에 대해서 抗原性を 나타내어 소위 自家抗原(auto-antigen)이 되며 그 개체내에서 이에 특이하게 對抗하는 抗體 즉 自家抗體(autoantibody)가 形成되어 自家抗體와 自家抗原의 相互作用으로 인한 반응들이 組織損傷을 일으키는 것을 말한다¹¹⁾.

류마티스關節炎의 自家免疫反應 과정을 요약하면, 원인불명의 Agent X의 侵入과 人체 遺傳因子的 선택적인 결합으로 宿主에 免疫反應을 일으키고⁸⁾, 滑膜에서는 T 淋巴球, B 淋巴球 및 大食세포가 활성화

화되며 T 淋巴球에서는 lymphokine이 생산 분비되고, 形質세포에서 생산된 면역 globulin은 免疫複合體를 형성하여 보체를 활성화시킨다.

앞서 언급한 세포들 뿐 아니라 血管內皮 세포, 滑膜세포, 軟骨세포 등 다양한 세포들 또는 이들 세포들의 生産物들의 複雜한 相互作用에 의해 炎症이 증폭되고 關節滑膜의 비후와 軟骨의 파괴를 초래하게 된다⁴⁾.

이와 같이 류마티스關節炎이 自家免疫疾患으로 생각되고 있는 주된 이유는 첫째로 患者의 關節組織에서 局所 免疫反應의 特徵을 보이는 단핵구 세포의 浸潤이 발견되고, 炎症을 보이는 滑膜에서는 CD4 陽性 T 세포, 활성화된 B 淋巴球와 plasma 세포, 大食세포등이 발견되며, 滑液內에는 이들 활성화된 淋巴球나 大食세포들이 분비한 다양한 cytokine들이 발견된다.

둘째는 自家抗體가 患者의 血液과 關節에 존재한다는 것이다. 류마티스關節炎에 가장 특징적인 自家抗體로 주목을 받아온 것은 IgG 抗體의 Fc 부분에 特異性을 가지는 류마티스 抗體이나 류마티스關節滑液에는 그 외에도 抗-DNA, 抗-histone, 抗-collagen, 抗-heat shock protein(HSP) 등의 自家抗體들이 존재하고 있으며, 이들이 局所的으로 關節內에서 생산된다는 증거도 있기 때문이다¹²⁾.

류마티스關節炎의 一般的 治療는 일차약으로 aspirin 및 NSAID, corticosteroid제제를 쓰고 이차약으로 소위 항류마티스제제에 속하는 약물이며 진통효과는 없고 약물 투여후 효과가 나타나기까지 수주에서 수개월이 필요하다. 삼차약으로 methotrexate, azathioprine 등의 cytotoxic agent와 기타 실험적인 치료법이 쓰인다⁵⁾.

韓醫學에서는 痺證은 風寒濕의 邪氣가 肢體와 關節을 侵犯하여 疼痛, 麻木, 重着, 關節腫大, 屈伸不利 및 活動障礙를 일으키는 疾患으로³¹⁾ 이 가운데 關節症狀은 서양의학적 病名인 류마티스關節炎과

類似한 症狀으로 여겨진다³³⁾.

이 關節症狀은 <金匱要略>²⁶⁾에서 “歷節病, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體羸羸, 脚腫如脫”이라 하여 그 症狀을 描寫하고 있으며, 古代로 歷節病, 白虎病¹⁹⁾, 白虎歷節風³⁰⁾등으로 表現하고 있는데 이들은 모두 痺證의 範疇에 속하는 것으로 볼 수 있다²⁸⁾.

韓醫學에서 류마티스關節炎의 治療에 있어서 祛風除濕, 活血化瘀, 通經活絡하는 약물을 많이 쓰고 있는데, 특히 蟲類 藥物인 蜈蚣, 全蠍, 烏梢蛇, 白花蛇, 穿山甲, 虻蟲 및 水蛭과 같은 藥物은 免疫反應作用을 抑制시키는 것으로 報告 되어있다⁹⁾.

藥鍼療法은 刺鍼과 약물을 결합시킨 新鍼療法으로 刺鍼과 약물을 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 改善시켜 疾病 治療의 目的을 達成하는 治療법인데, 그 適應症이 廣範圍하고 효과가 빠르며 難治 혹은 複雜한 病에 효과적이고 造作方法이 簡便하며 外用藥으로 滲透하기 어려운 부위에 이용 가능한 장점이 있다²⁰⁾.

本 실험에 使用된 桂枝(Ramulus Cinnamomum)는 樟科에 속한 常綠喬木인 육계나무 및 同屬 近緣 植物의 잔가지를 건조한 것으로, 性味는 辛·甘·溫·無毒하고, 發汗解肌·溫通經脈·通陽化氣의 效能을 지니고 있다. 發汗解肌의 效가 있어 風寒의 表症에 주로 이용되고 있으나, 經脈을 溫通시키는 作用이 강하여 寒濕으로 인한 風濕痺痛 등의 證을 다스리는데 利用되고 있다. 흔히 寒濕性의 風濕痺痛에는 附子, 姜活, 防風 등의 藥物을 배합하여 응용한다¹³⁾.

陽陵泉^{16), 27)}은 一名 筋會로서 膝下 1寸 脛外廉陷中으로 腓骨小頭의 前下方에 있는 陷凹部이며 屈膝 取穴한다.

筋肉의 分布는 長腓骨筋腱과 長趾伸筋腱이며, 신경의 分포는 總腓骨神經과 淺腓骨神經, 深腓骨神經, 外側背腹皮神經이 있고 혈관은 腓骨動脈, 前脛骨動靜脈, 前脛骨反回動脈이 분포되어 있다.

刺鍼法은 주로 直刺 8分~1寸2分, 留10呼吸하며 斜刺인 境遇는 1~2寸 鍼尖은 脛骨後緣을 향해 斜刺로 刺入한다. 穴性은 舒筋脈, 清泄濕熱하며, 足少陽膽經의 合穴, 八會穴中 筋會穴, 六腑下合穴中 膽下合穴이다.

치료효과는 下肢外側痛, 筋病下肢筋虛弱, 下肢麻木不伸, 下脚痛, 筋痙攣, 坐骨神經痛, 半身不遂, 偏癱, 筋間神經痛, 口苦, 肝炎, 膽囊炎, 高血壓, 胸脇痛, 急驚風, 癲癩, 咳嗽, 瘰癧, 子宮出血, 白帶下, 胸脇炎, 顔面神經麻痺등을 치료한다¹⁶⁾.

關節炎에 對한 藥鍼효과에 관한 報告로는, 김 등^{7),10),21)}이 LPS 誘發關節炎에서 藥鍼刺戟이 cyt-okine에 미치는 效果를 報告하였고, 嚴等¹⁷⁾, 李等²⁵⁾ 및 申等¹⁵⁾이 第Ⅱ型 Collagen 誘發關節炎에서 藥鍼刺戟이 抗體에 미치는 影響을 報告하였으며, 申等^{14),32)}은 藥鍼刺戟이 Adjuvant誘發關節炎에 對하여 消炎, 鎮痛 및 解熱등의 效果가 있다고 報告하였고, 劉²³⁾ 등이 關節炎 患者에게 溫鍼 및 藥鍼刺戟을 하여 末梢血液의 NK와 IL-2의 活性도가 低下되었다고 報告하였고, Zhu 등⁴⁵⁾은 류마티스關節炎 患者 82名에게 艾灸를 施行하여 ESR이 감소하고, RA factor가 陰性으로 바뀌었으며, hemoglobin과 E-rosett 形成이 증가하였다고 報告하였으나 桂枝를 藥鍼으로 사용하여 세포性 免疫反應을 관찰한 실험 報告는 없었다.

이에 著者는 LPS로 생쥐에 關節炎을 誘發시킨 후, 桂枝를 藥鍼으로 사용하여 陽陵泉을 자극 CD4 陽性 T 淋巴球, CD8 陽性 T 淋巴球, macrophage, IL-1 β , IL-2R, VCAM-1에 대한 細胞性免疫反應의 變化를 관찰하였다.

LPS는 動物에 各種의 實驗의 自家免疫病을 誘發하는 物質로¹⁸⁾, macrophage를 자극하여 IL-1의 分泌를 유발하여 T 淋巴球 應答을 촉진시키고^{18),40)}, 炎症反應 媒介物質인 TNF- α 의 分泌를 誘發시키며⁴⁰⁾, PGE2(prostaglandin E2)의 生成도 증가시키

서, 關節腔內 注射할 경우 일과성의 急性 關節炎을 유발할 수 있다⁴⁰⁾.

免疫系는 淋巴球 및 單核食균세포와 부속세포로 構成되며, 抗原에 對해 特異免疫 능력을 가지고 있는 유일한 세포집단은 淋巴球이다. 淋巴球는 형태적 으로 일정하지만 서로 다른 기능을 갖고 있으며, 표현형이 다른 특정적인 부류들로 構成되어 있어 구별할 수 있다.

B 淋巴球는 抗體를 生成하는 세포이며, 따라서 體液性 免疫反應의 因子이다. T 淋巴球는 CD4 표면표지를 발현하며, B 淋巴球가 抗體를 生成하는데 자극하는 도움 T 淋巴球로서 기능을 하거나 탐식된 미생물을 파괴하는 大食세포의 기능을 활성화시키는데 관여한다.

또 다른 T 淋巴球는 CD8 표면표지를 가지며 외 래항원을 가지는 표적세포를 죽이는 세포독성 (cytotoxic) T 淋巴球로서의 기능을 가지는데³⁾ 이 T 淋巴球는 류마티스關節炎의 炎症反應의 시작 및 진행에 있어서 免疫學的으로 核心的인 役割을 하는 것으로 알려져 있고⁴²⁾, 동물 모델에서는 여러 가지 抗原에 의해 刺戟받은 T 淋巴球가 關節炎을 일으키며²⁴⁾, T 淋巴球를 감소시키면 류마티스關節炎이 호전된다고 한다^{24),42)}.

桂枝藥鍼을 刺戟한 후 측정된 結果, 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 CD4와 CD8의 陽性反應 세포수의 감소와 陽性反應性이 약화되는 것을 관찰할 수 있었다.

Macrophage는 세포표면에 CD11b, CD11c 및 CD14 등의 marker 抗原을 가지며 신체에 浸透한 抗原을 貪食하여 죽이는 貪食作用과 T 淋巴球에게 抗原을 인지하게 하는 '抗原提示세포'로서 활동하며²⁹⁾ 류마티스關節炎에서는 IL-1 β 와 TNF- α 등 關節炎을 유발하는 炎症性 cytokine을 분비한다³⁷⁾.

이 實驗에서는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 CD11b 陽性反應 세포수의 감소와 陽性反應

腫이 악화되는 것이 관찰되었다.

Cytokine이란 세포가 만드는 세포간의 signal 전달에 관여하는 液性因子를 총칭하며 이 중에서 白血球와 白血球 사이에서 signal을 전달하는 因子는 interleukin이라 부르며 IL-1을 비롯하여 현재까지 13종이 발견되었다¹⁸⁾. 이들은 류마티스關節炎에서 염증과 關節破壞의 중요한 매개체들이다. 비록 이들 물질들은 정상세포기능에 중요한 역할들을 하나, 지나친 생산과 부적절한 억제에 의해 병적상태를 야기할 수 있다⁴⁾.

IL-1은 주로 macrophage에서 생성이 되는 cytokine의 하나로 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 형태가 있으며⁴¹⁾, TNF- α 와 더불어 關節炎의 발병에 가장 직접적으로 관여한다고 알려져 있다³⁴⁾.

이 IL-1과 TNF- α 는 滑膜의 纖維亞세포와 軟骨세포등에서 교원섬유 분해효소와 단백질분해효소의 분비를 촉진시키며 關節軟骨 표면의 proteoglycan의 형성을 억제하고 교원섬유의 분해를 야기하여 결국 關節軟骨의 破壞를 유도하는데 주된 역할을 한다³⁴⁾.

이 實驗에서는 藥鍼刺戟群에서 IL-1 β 陽性反應 세포가 關節炎誘發群에 비하여 그 분포가 감소된 것으로 관찰되었다.

IL-2(Interleukin-2)는 주로 活性化된 T 淋巴球에서 생산, 방출되는 免疫調節機能을 가진 lymphokine으로^{1),18)}, IL-2R를 表出した T 淋巴球, B 淋巴球 및 NK세포에 작용하여 이들의 성장과 분화를 촉진하고^{18),29)}, γ -interferon 分泌를 誘發하여 macrophage를 活性化시키며, lymphokine 活性殺害세포(lymphokine activated killer, LAK)의 형성을 촉진하여 免疫機能을 증진한다^{1),29)}.

이러한 IL-2는 세포막의 IL-2R과 결합하여 標的세포의 成長과 增殖을 일으키고³⁵⁾, 그 생산은 IL-2R에 의하여 촉진되는데³⁹⁾, IL-2R은 免疫反應이 일어나는 동안 活性化된 T 淋巴球, B 淋巴球 및

macrophage 등에 많이 나타나며^{6),35)}, 腫瘍患者, 自家免疫性疾患, 알레르기 疾患 등 患者들의 血清에서 發見되는데²⁹⁾, 이들은 도움 T 淋巴球의 活性化를 反映하여 류마티스關節炎의 關節滑液膜에서 T 淋巴球의 活性化도를 측정하는데 이용되고 있다³⁸⁾.

이 實驗에서는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 비하여 IL-2R 陽性反應세포의 分布가 減少된 것으로 觀察되었다.

세포癒着分子는 세포표면에 존재하는 glyco-protein으로 크게 Selectin(e.g., L-, P-, E-selectin), integrin(e.g., LFA-1, Mac-1, VLA-4), immunoglobulin superfamily(e.g., ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, CD2, LFA-3) 등의 3계열과 Cadmlwhs형 Cadherin, 淋巴球를 특정 임파 조직으로 모이게 하는 CD44(H-CAM)등으로 구분된다.

이는 세포관련 免疫反應에서 抗原이 T 淋巴球에 인식되기 위해 T 淋巴球와 抗原處理세포 사이에 直接的인 相互作用이 필요하며, 순환중인 T 淋巴球를 비롯한 여러 炎症세포가 組織에 도달하려면 炎症세포와 血管內皮 세포간에 결합이 선행되어야 한다. 이 과정에서 각 세포간의 相互作用을 媒介하는데 필요한 물질이다³⁶⁾. 이는 류마티스關節炎에서 淋巴球가 內皮세포에 癒着되어 循環系를 떠나 滑膜에 浸潤되고 여러 세포들과 相互作用하는 전과정에 참여한다⁴³⁾.

VCAM-1은 Immunoglobulin superfamily에 屬하는 세포癒着分子로 초기의 血管內皮세포와 白血球의 接觸에 관여하는 Selectin 계열의 E-Selectin 보다 약간 늦게 발현되어 VCAM-1의 白血球 수용체인 β -1 integrin VLA-4가 발현되어 있는 단핵구나 淋巴球를 血管內皮세포에 附着시킨다⁴⁴⁾.

이 實驗에서는 VCAM-1(CD106) 陽性反應세포가 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 비하여 減少하는 樣相을 보였다.

以上的 結果로 보아 桂枝藥鍼刺戟이 류마티스關節炎 動物모델의 細胞性免疫反應을 抑制하는 것이 관찰되어, 초기 류마티스關節炎의 鍼灸學的 治療에 應用 가능하리라 생각되며, 앞으로 桂枝藥鍼의 體液性免疫反應에 對한 效과와 作用機轉에 關한 繼續的인 研究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結論

桂枝藥鍼刺戟이 류마티스關節炎의 발생에 있어서 免疫組織化學的 變化에 미치는 影響을 觀察하기 爲하여 mouse에 LPS 處置 第2日후부터 2日 間격으로 陽陵泉(Gb₃₄)에 桂枝藥鍼을 100 μ l씩 總 6回 刺戟한 後 CD4 陽性 T 淋巴球, CD8 陽性 T 淋巴球, IL-1 β , IL-2R, VCAM-1에 對한 細胞性免疫反應의 變化를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 온영덩淋巴節內의 CD4 陽性 T 淋巴球 及 CD8 陽性 T 淋巴球 分布는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 減少하였다.
2. 온영덩淋巴節의 macrophage 分布는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 減少하였다.
3. 關節滑液膜內의 IL-1 β 分布는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 減少하였다.
4. 關節滑液膜內의 IL-2R 分布는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 減少하였다.
5. 關節滑液膜內의 VCAM-1 分布는 藥鍼刺戟群에서 關節炎誘發群에 比하여 減少하였다.

VI. 참고문헌

1. 권명상 외 5인 : 임상면역학, 고려의학, 서울, 1998: p.104,pp.166~168.
2. 권은경·신혜인 : 약침조제법연구, 서울, 약침학회 부설약침연구소, 1998: pp.648~649.
3. 김광혁 외 : 세포, 분자 면역학, 정문각, 서울, 1998: p.60.
4. 김동집 외 2인 : 류마티스 관절염의 병인, 대한류마티스학회지, 1994; 1~1: pp.1~12.
5. 김성운 외 1인 : 류마티스 관절염의 내과적 治療, 대한의학협회지, 1992; 35~10: pp. 1223~1229.
6. 김신규 : 류마티스관절염의 면역혈청학적 검사, 대한의학협회지 1992; 35(10): pp. 1207~1212.
7. 김철호·이상인·안덕균 : Human Monocyte 의 IL-8생산억제에 미치는 류마티스관절염 治療제로서의 五加皮의 效과, 大韓本草學會誌 1995; 10: pp.49~58.
8. 김호연 : 류마티스 관절염의 병인, 대한의학협회지, 1992; 35~10: pp.1198~1206.
9. 駱和生 : 면역과 한방, 열린책들, 서울, 1994: p.116.
10. 박철원·김갑성 ; Lipopoly saccharide유발 토끼 관절염에서 黃柏藥鍼이 관절염증의 억제에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1998; 15: pp.229~248.
11. 서울대학교 의과대학 : 면역학, 서울, 서울대학교 출판부, 1982: pp.1~25, 229~246.
12. 손정원 외 4인 : 류마티스 관절에서 유래된 B-림프구선의 항체 경사슬 가변부 유전자에 關한 研究, Korean J. Immunol. 1995; 17: pp.65~72.

13. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林出版社, 1988: pp. 518~519.
14. 申敏湜·李鍾秀 : 防風湯이 Adjuvant 誘發關節炎에 미치는 影響, 東醫物理療法科學會誌. 1994; 4: pp.135~146.
15. 申炳熙 외 2인 : 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, 1994; 4: pp.121~133.
16. 安榮基 : 經穴學叢書, 서울, 成輔社, pp.234~235, 1986.
17. 嚴載元 외 4인 : 骨擔草가 제Ⅱ형 Collagen 誘發關節炎의 抗體에 미치는 影響, 東醫物理療法科學會誌, 1995; 5: pp.149~161,
18. 오찬호 역 : 신면역학입문, 지구문화사, 서울, 1995: p.118,p.119,p.121,p.183,
19. 王燾 : 外臺秘要, 文光圖書有限公司印行, 中華民國68年: p.369,
20. 劉建洪 外 : 穴位藥物注射療法, 江西省, 江西科學技術出版社, 1989: PP.1~31,
21. 柳京周 외 4인 : 白虎湯과 白虎加桂枝湯이 류마티스관절염 및 Human Monocyte의 IL-8에 미치는 영향, 東醫物理療法科學會誌. 1995; 5: pp.79~100.
22. 유빈 외 5인 : 백서의 콜라겐 유도성 관절염 발생에 미치는 Interleukin-10의 영향, 대한 류마티스학회지. 1997; 제4권 제 2호; pp.111~121.
23. 劉心蓮, 孫雨金, 肖君 : Effect of acupuncture and point-injection treatment on immunologic function in rheumatoid arthritis, J. Traditional Chinese Medicine. 1993; 13(3): pp.174~178.
24. 이수곤 : 류마티스관절염의 원인 및 증상, 대한의학협회지. 1992; 35(10): pp.1213~1222.
25. 李昊根 외 2인 : 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, 1994; 4: pp.87~99.
26. 張仲景 : 金匱要略方論, 臺北, 大聯國風出版社, 1973. pp.32~33.
27. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學(上), 서울, 集文堂, 1991: pp.648~649.
28. 정석희 : 비병의 문헌적연구, 서울, 대한한의학회지, 1995; 16(1): p.19.
29. 정태호 외 : 최신 면역학 강의, 서울, 경북대학교 출판부, 1996: p.22,p.215, p.215.
30. 朱震亨 : 丹溪心法, 大星文化社, 1989: p.206.
31. 黃文東 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, 1986: pp.554~556.
32. 황병태 외 2인 : 牛黃·熊膽 藥鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響, 藥鍼學會誌 1997; 1: pp.35~51.
33. 황우준 : 류마티스성 관절염에 대한 臨床적 고찰, 대한침구학회지. 1996; Vol.12, No.1: pp.281~290.
34. Arend WP, Dayer JM : Cytokines and cytokine inhibitors of antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1990; 33: pp.305.
35. Banerjee S, Wei BY, Hillman K, Luthra HS, David CS : Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with anti-IL-2 receptor antibody. J Immunol. 1988; 141(4): pp.1150~1154.
36. Kats AM, Rosenthal D, Sauder DN : Cell adhesion molecules : Structures, function, and implication in a variety of

- cutaneous and other pathologic conditions. *Int J Dermatol.* 1991; 30: pp.153~160.
37. Koch A.E., Kunkel S.L., Harlow S.L., Mazarakis D.D., Haines G.K., Burdick M.D., Pope R.M. and Striester R.M. : Macrophage inflammatory protein-1 α , The Journal of Clinical Investigation. 1994; 93: pp.921~928.
38. Kraft M., Filsinger S., Kramer K.L. Kabelitz D., Habsch G.M. and Schoels M. : Synovial fibroblasts as accessory cells for sytphylococcal enterotoxin-mediated T-cell activation, *Immunology.* 1995; 85: pp.461~466.
39. McHugh S, Deighton J, Rifkin I, Ewan P : Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture. *Eur J Immunol.* 1996; 26(6): pp.1260~1265.
40. Noyori K., Okamoto R., Takagi T., Hyodo A., Suzuki K. and Koshino T. : Experimental induction arthritis in rats immunized with esherichia coli 0 :14 Lipopolysaccharide, *The Journal of Rheumatology.* 1994; 21: pp.484~488.
41. Nunemori E.N., Ehsain N., Wang M. Lee S., McGuire J. and Amento E.P. : interleukin-1 and transforming growth factor- α : synergistic stimulation of metalloproteinase, PGE₂ and Proliferation in human Fibroblasts, *Experimental Cell Research.* 1994; 210: pp.166~171.
42. Paget SA and Gibofsky A : Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 1979: pp.961~970.
43. Pitzalis C, Kingsley GH, Panayi GS: Adhesion molecules in rheumatoid arthritis : Role in the pathogenesis and prospects for therapy. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: pp.287~288.
44. Rice GE, Munro IM., Corless C., Bevilacqua MP : Vascular and nonvascular expression on INCAM-110 : A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissue. *Am J pathol.* 1991; 138: pp.385~393.
45. Zhu Yuewei, Cheun Xiaoyao, Han Hanguang, Zhang Yao : The influence of moxibustion on immune function in the treatment of rheumatoid arthritis, *American Journal of Acupuncture.* 1991; 19(4): pp.315~317.