

원저

# 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 대한 자하거(紫河車) 약침의 효과

## Abstract

### Therapeutic effects of Hominis placenta herb-acupuncture in adjuvant-induced arthritis rat

Mijung Yeom, Ji-Eun Kang, Dae-Hyun Hahm\*, Hi-joon Park<sup>1</sup>, Eunjoo H. Lee, In-Sop Shim, Hye-Jung Lee

Lab. of Acupuncture & Meridian, Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Youngin-si, Kyungki-do 449-701; <sup>1</sup>Department of Meridianology, College of Oriental medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by leukocyte infiltration, a chronic inflammation of the joint, a pannus formation and the extensive destruction of the articular cartilage and bone. Several proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 6 (IL-6) have been implicated in the pathological mechanisms of synovial tissue proliferation, joint destruction and programmed cell death in rheumatoid joint. In the Korean traditional medicine, Hominis placenta (HP) as an herbal solution of herb-acupuncture has been widely used to treat the inflammatory diseases including RA. In order to study the medicinal effect of HP herb-acupuncture on rheumatoid joint, an adjuvant-induced arthritis (AIA) was generated by the injection of 1.5 mg of Mycobacterium tuberculosis, emulsified in squalene, to the base of the tail of Sprague-Dawley (SD) rats. After onset stage of polyarthritis, HP was daily injected to the Zusanli (ST36) acupuncture points in both of rat lags and the expression patterns of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 at the knee joint were analyzed using immunostaining and RT-PCR. The HP herb-acupuncture was found to be effective to alleviate the arthritic symptoms in adjuvant-induced arthritic rats as regards the joint appearance and the expression profiles of inflammatory cytokines. In conclusion, therapeutic effects of HP herb-acupuncture on the rat with AIA might be related to anti-inflammatory activities of the hurb-acupuncture.

**Key words** : rheumatoid arthritis, Hominis placenta, adjuvant-induced arthritis, inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6)

## 1. 서론

류마티스 관절염은 만성 염증성 자가 면역 질환이다<sup>1,2,3,4</sup>. 류마티스 관절염이 발병되면 여러 가지 염증 세포의 침윤과 관절 내의 만성 염증 반응이 일어나고 pannus의 형성으로 인하여 연골의 파괴와 관절의 부식

및 변형을 초래하게 된다<sup>5</sup>. 류마티스 관절염의 원인은 아직까지 정확하게 규명되지 않았으나, 어떤 항원 물질에 대한 생체 면역 반응 결과 생산되는 cytokine을 비롯한 주요 면역 반응 매개 물질이 관여하여 지속적인 염증 반응을 나타냄으로써 연골이 손상되고 뼈의 손상을 가져와 관절 기능을 제대로 할 수 없게 되는 것으로

알려져 있다<sup>6)</sup>. 특히 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 그리고 interleukin 6 (IL-6)와 같은 proinflammatory cytokine이 염증 반응 및 관절 손상에 주요 역할을 하는 것으로 보고되어 있고 실제로 류마티스 관절염이 유발된 환자들의 관절 부위에서 많이 발견된다. 관절 내 뼈의 손상은 pannus의 침습에 의하여 일어난다<sup>4,6)</sup>. pannus는 여러 가지 염증 세포들의 덩어리로 연골을 파괴시키고 이어 연골하골 (subchondral bone)을 손상시켜 관절의 변형을 가져오며 관절 주위에 있는 뼈 또한 약화시킨다<sup>7)</sup>.

현재 류마티스 관절염에 대한 가장 보편적인 치료 방법은 비스테로이드성 소염제 및 항류마티스 약제 등의 이용이다. 비록 이러한 약물의 이용은 통증을 완화시키고 염증을 억제하며 관절의 기능 소실을 최소화하는 효과를 나타내고 있으나 여러 장기의 기능 저하, 우울증, 세균감염 등의 부작용이 발생할 수 있다<sup>8,9)</sup>. 따라서 부작용이 적고 안전성이 높은 더욱 효과적인 류마티스 관절염 치료법의 지속적 개발이 요구되고 있다.

약침요법은 경락학설에 근거하여 유효한 혈위나 압통점, 혹은 체표의 양성반응점에 정제된 각종약물을 주입하여 자침효과와 함께 약물의 약리 작용을 통하여 질병의 치료효과를 높이는 요법으로, 특정 수혈에 자침하여 경맥의 기능을 조절함으로써 정신기혈·오장육부의 질병을 치료하는 침구·경혈학의 이론과 한약의 기미 성상 작용을 살피 임상 치료 효율을 극대화시키고 약물을 인체의 기관이나 병소에 접근, 작용시키는 기전을 연구하는 본초학의 이론을 결합시킨 신침요법이다<sup>10,11)</sup>. 자하거 약침은 한약의 보약 (益氣, 養血, 補精) 중의 하나인 자하거(紫河車)의 기미를 추출하여 주로 만성허로성 질환을 치료하는 약침요법으로 난치병 및 만성질환에 광범위하게 응용되고 있다<sup>12)</sup>.

adjuvant 관절염은 류마티스 관절염의 공인된 동물모델로 항염작용에 대한 실험에 많이 이용되고 있으며 관절의 부종, 몸무게의 감소와 같은 임상적 증상은 물론, 면역세포의 침윤과 활액막 세포의 활성화 등과 같은 조직학적 변화에 있어 인간의 류마티스 관절염과 유사한 병증을 보인다<sup>13)</sup>.

본 연구에서는 AIA 동물모델을 이용하여 만성 난치성 질환의 하나인 류마티스 관절염에 대한 자하거 약침의 효능을 알아보고자 하였다.

## II. 실험 방법

### 1. 실험동물

체중 120g 가량의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐로서 고형 사료 (신촌사료; 小동물용, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 7일 동안 적응시킨 후 사용하였다. 실험 시작시 몸무게는 120~140g이었으며 4~5마리씩 개별 cage에 수용하였다. 주야 조명 주기는 12시간 (조명상태; 08:00~20:00, 소등상태; 20:00~08:00)으로 하여 충분한 먹이와 물을 공급하였다.

### 2. 약침액 및 약침 주입기

자하거 약침액은 대한약침학회에서 조제한 실험용을 사용하였다. 약침 주입기는 1.0ml의 1회용 주사기 (26gauge, 동신메디텍, 한국)를 사용하였다.

### 3. 관절염 유발

Santos<sup>14)</sup>, Leech<sup>15)</sup> 등의 방법에 따라 squalane에 유화시킨 1.5 mg의 Mycobacterium tuberculosis H37RA를 흰쥐의 꼬리 기저부에 피내 주사하였다. 정상군은 동량의 멸균된 증류수를 동일한 방법으로 주사하였다.

### 4. 실험군 분류 및 약침액의 투여

흰쥐를 1군 당 4-5 마리로 하여 관절염을 일으키지 않은 정상군, 관절염을 유발한 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군, 족삼리 (ST36)에 자하거 약침을 처치한 치료군 (HP/Z군), 비혈위에 자하거 약침을 처치한 군 (HP/B군)으로 나누었다. 실험군은 관절염 유발 후 증후가 나타난 11일에 증후의 정도에 따라 동물을 선발하여 분류함으로써 자하거 약침 치료 시작시 각 군 당 발병 정도가 유사하게 하였다. 약침액의 투여 혈위는 족삼리(ST36)를 선정하였고, 그 위치는 인체와 해부학적으로 상응하는 부위로 양측으로 취혈하였으며 비혈위는 기저 부위 임의점의 피하 주사하였다. 약침 치료는 임상적 발병이 시작된 11일부터 25일까지 총 15일간 1일 1회 0.1ml씩 주입하였다. 정상군과 대조군은 족삼리 양측에 동일량의 식염수를 주입하였다.

5. 임상적 측정

1) 몸무게

관절염 유발 직후부터 실험 종료일까지 체중계를 이용하여 3-4일 간격으로 측정하였다.

2) 뒷다리 부종

관절염 유발 직후부터 실험 종료일까지 Water Displacement Plethysmometer (UGO BASIL, Italy)를 이용하여 양쪽 뒷발바닥의 용적을 측정하였다. 각각 3회씩 측정한 후 평균값을 사용하였다.

3) 관절염 지표(arthritis index)

관절염 유발 직후부터 실험 종료일까지 관절 주위의 부종이나 발적 등 임상적 관절염의 증후에 대하여 관찰하였다. 관절염 지표는 아래 기준으로 채점되었고 각 동물 당 최고 점수는 16점 (4점×4肢)이 부여되었다.

- 0 = no swelling or erythema
- 1 = slight swelling and/or erythema
- 2 = low to moderate edema
- 3 = pronounced edema with limited joint usage
- 4 = excess edema with joint rigidity

6. 유전자 발현 변화 양상의 측정

1) RNA의 정제

관절염 유발 후 25일째 되는 날에 흰쥐의 뒷다리로 부터 피부와 근육조직을 제거하고 슬관절을 추출하여 즉시 액체질소에 얼린 후 -80°C에 보관하였다. total RNA는 TRIzol™(GIBCO BRL, MD, USA)을 사용하여 흰쥐의 슬관절로부터 추출하여 분광분석기로 260nm에서 정량한 후 -80°C에서 보관하였다.

2) 역전사 종합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

3µg의 total RNA를 65°C에서 15분 동안 denaturation시킨 후, 200 U moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL, MD, USA)을 이용하여 최종

부피가 25µl인 반응 혼합액에서 역전사 반응을 수행하여 cDNA mixture를 얻었다. cDNA는 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4 mM의 각 primer와 0.5 U Taq polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan)을 포함한 20 µl의 반응 혼합액에서 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭되었다. 각각의 primer는 Genbank에 기록된 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였으며 각각의 염기서열은 아래와 같다.

- ① GAPDH  
forward 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'  
reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
- ② TNF-α  
forward 5'-GTCGTAAACCACCAAGC-3'  
reverse 5'-GACTCCAAAGTAGACCTGCC-3'
- ③ IL-1β  
forward 5'-GGCATAACAGGCTCATCTGG-3'  
reverse 5'-CATCATCCCACGAGTCACAG-3'
- ④ IL-6  
forward 5'-CCACTGCCTTCCCTACTTCA-3'  
reverse 5'-TGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'

각각의 증폭반응의 조건은 다음과 같다. GAPDH는 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 45초의 반응주기를 30회 반복하였고 TNF-α와 IL-1β는 94°C 45초, 58°C 45초, 72°C 90초의 반응주기를 35회 반복하였으며 IL-6는 94°C 60초, 63°C 60초, 72°C 120초의 반응주기를 40회 반복하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. gel 상의 band intensity는 ImageMaster TotalLab (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 이용하여 분석하였고 내부 표준물질로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하여 유전자의 정량적 발현 수준을 보정하였다.

7. 조직 검사

1) 조직절편의 slide 제작

모든 동물은 sodium pentobarbital로 마취한 후 식염수와 인산염 완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에

녹인 4% paraformaldehyde(PFA)용액으로 관류고정하였다. 슬관절을 적출하여 4% PFA에 담가서 4°C에서 12~16시간 동안 후고정하였다. 고정된 슬관절 조직은 PBS에 녹인 10% EDTA 용액에서 4-5주간 탈회하였다. 탈회된 슬관절은 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol을 이용하여 탈수하고 xylene으로 투명하고 paraffin용액으로 침윤시킨 후 paraffin으로 포매한다. 조직은 10 $\mu$ m 두께로 sagittal section을 만들어 poly-L-lysine-coated slide에 올려놓았다.

## 2) 조직 염색

HE (hematoxylin-eosin) staining은 보편적인 염색 방법을 적용하였다. 각 절편은 탈paraffin시킨 후, 100%, 90%, 80%, 70% 단계별 ethanol로 함수시키고 Harris hematoxylin 용액에 7분간 염색한 뒤 1% HCl alcohol 용액과 ammonia로 침적시킨 다음, eosin 용액으로 30초간 염색하였다. 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol을 이용하여 순차적으로 탈수시킨 후 xylene으로 투명한 뒤 봉입하여 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

## 3) 면역조직화학법

면역조직화학법 (immunohistochemistry, IHC)은 vector avidin-biotin complex (ABC) kit (Vector, CA, USA)와 diaminobenzidine (DAB)을 이용하여 실시하였다. 조직절편은 탈 paraffin 하고 함수한 후, tween-20을 포함한 tris-buffered saline 용액(TBST)으로 세척하였다. 0.3% 과산화수소를 포함한 TBST에 30분간 반응시켜 내재성 peroxidase를 비활성화시키고, 10% goat serum, 1% bovine serum albumin (BSA) 용액과 반응시켜 비특이적 결합을 제거하였다. rabbit polyclonal anti-rat TNF- $\alpha$  (1:500 dilution; Endogen, Woburn, MA, USA), rabbit polyclonal anti-rat IL-1b (1:500 dilution; Endogen, Woburn, MA, USA) 또는 rabbit polyclonal anti-rat IL-6 (1:500 dilution; Santa Cruz biotech, Santa Cruz, CA, USA)의 1차 항체용액으로 4°C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. TBST로 세척 후에 biotinylated anti-rabbit IgG 2차 항체 용액에서 1시간 반응시키고 Vectastain Elite ABC reagent (Vector, Burlingame, CA, USA)로 실온에서 1시간 반응 후 발색제 DAB으로 상온에서 발색한 후 TBST로 세척하여 발색을 중지시켰다. 발색이 끝난 조직은 ethanol로 탈수하고 xylene으

로 투명화시킨 뒤 봉입하여 광학현미경의 관찰하고 사진을 촬영하였다.

## 8. 통계분석

실험군 중 두 군간의 비교는 paired t-test로 검증하였고 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의한 차이가 있는 것으로 인정하였다.

## III. 실험 결과

대부분의 동물 (90-100%)에서 관절염이 유발되었다. 관절 주위의 부종, 홍반 등의 임상적 양상은 관절염 유발 후 10-11일부터 나타났으며, 유발 후 17일에는 가장 극심한 부종과 발적이 관찰되었다 (Fig. 1).

### 1. 임상적 지표의 변화

체중, 다리 부종, 관절염 지수를 임상적 지표로 선정하였다.

#### 1) 체중

정상군의 몸무게는 계속 증가하였다. 대조군의 경우 관절염의 임상적 증후가 나타나기 전까지는 증가하다가 증후가 보이기 시작한 11일 이후부터는 감소하기 시작하였다. 족삼리에 자하거 약침을 처리한 HP/Z군 역시 관절염의 증후가 보인 이후부터 몸무게가 감소하였으나 그 감소율이 대조군에 비하여 현저히 낮았으며 제 17-18일 이후부터는 증가하기 시작했다. 비혈위에 자하거를 주사한 HP/B 군의 경우 그 양상이 대조군과 매우 유사하게 나타났다 (Fig. 2).

#### 2) 부종

정상군의 경우 관절 부위의 변화가 없었다. 반면 대조군과 HP/B군에서는 관절 부위의 부종이 관절염 유발 후 제 11일부터 나타나서 급격히 증가하여 제 17일에 최고조에 도달하였고 이후 계속 지속되었다. 이에 비해 HP/Z군 또한 제 10일부터 관절 부위의 부종이 시작되었으나 그 증가율이 대조군과 HP/B군에 비하여 비교적

낮았으며 제 17일 이후부터는 서서히 감소하기 시작하였다 (Fig. 3).

### 3) 관절염 지수

관절염 지수의 경향은 부종의 경향과 유사하였다. (Fig. 4) 대조군과 HP/B군의 관절염 지수는 제 11일부터 급격히 증가하여 실험 종료 시에는 대부분의 동물들이 최고 점수인 16점에 도달하였다. HP/Z군은 자하거 약침 처치 초반에는 대조군이나 HP/B군과 비슷하게 관절염 지수가 증가하였으나 제 14일 이후부터 그 증가율이 낮아져 실험 종료 시에는 점수 자체가 감소하였다.

### 4. 관절 내 조직학적 비교

H-E staining을 통해 각 실험군 간의 조직학적 비교를 하였다.(Fig. 5) 정상군의 연골 표면이 매끄러운 반면 대조군의 경우는 연골 및 뼈의 파괴를 일으키는 pannus와 관절 내 뼈의 부식이 관찰되었다.(Fig. 5 A, B) HP/Z군의 연골층이 확대되었으나 그 표면은 매끄러웠고 pannus의 형성도 보이지 않았다.(Fig. 5 C) 또한 정상군과 HP/Z군에 비하여 대조군의 관절 내의 연골과 활액막 (synovial membrane)에서 많은 침윤 세포가 관찰되었다. (Fig. 5 D, E, F)

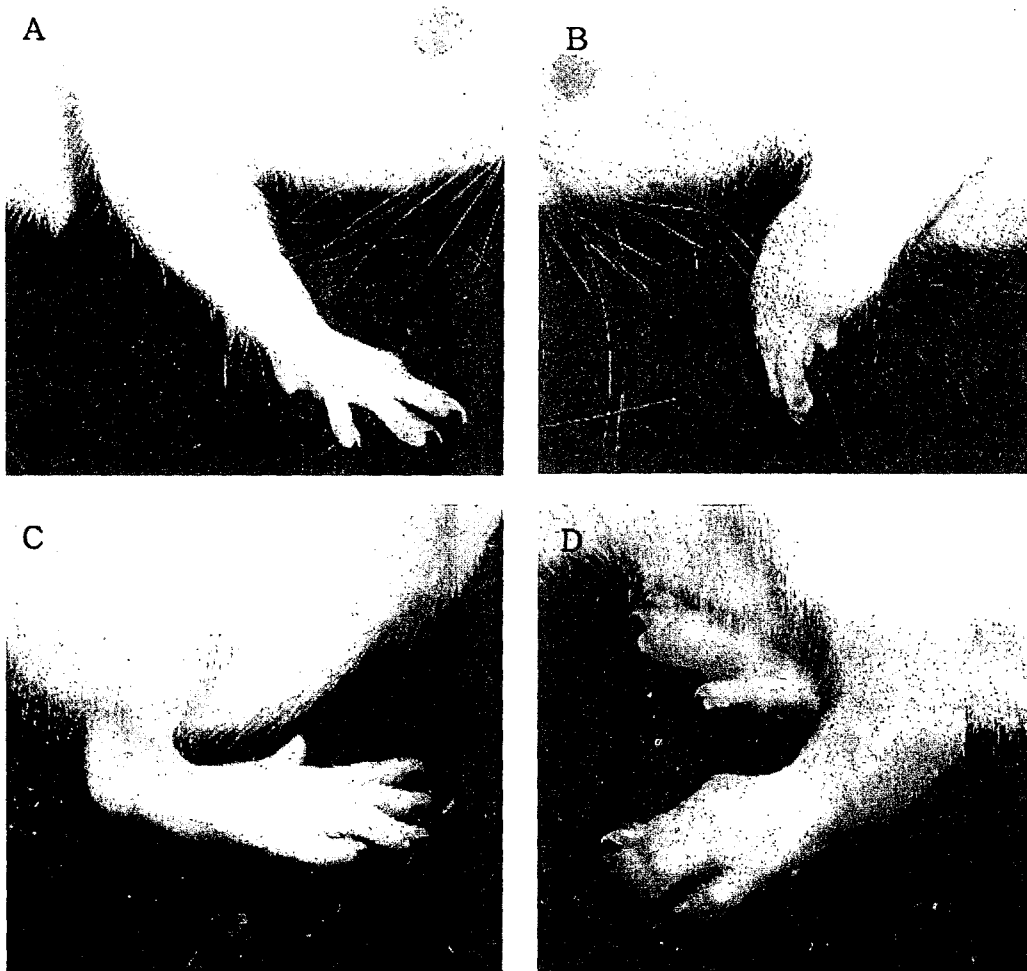


Fig. 1. Clinical expressions of AIA. Each paw was examined for periarticular erythema and oedema and was designated score of 0, 1, 2, 3 or 4 as described in materials and methods. Photographs illustrate representative examples of different scores: (A) normal forepaw (score 0); (B) forepaw with one type of joint affected (score 3); (C) normal hind paw (score 0); and (D) hind paw with maximal score (score 4).

5. 슬관절 내의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현

transcription 수준에서의 발현 양상을 관찰하기 위해서 RT-PCR을 이용하여 전체 관절 내의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA의 발현 양을 측정해 보았다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA의 발현 양상은 전반적으로 모두 비슷하였다. 정상군과 비교하여 대조군과 HP/B군은 높은 발현을 보였다. HP/Z군의 경우, 정상군에 비하여 발현양이 약간 높았으나 대조군이나 HP/B군에 비해서는 현저히 감소하였다. 특히 IL-6 mRNA의 발현이 뚜렷한 증가를 보였다. 상대적인 발현 정도를 비교하기 위해서 내부 표준물질인 GAPDH로 보정하여 비교하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 경우 정상군 23%, 대조군 56%, HP/Z군 42%, HP/B군 79%을 나타내었고, IL-1 $\beta$ 의 경우 정상군 32%, 대조군 74%, HP/Z군 55%, HP/B군 81%을 나타냈다. IL-6의 경우 정상군 64%, 대조군 133%, HP/Z군 75%, HP/B군 156%을 나타냈다.

6. 연골하골에서의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 발현

연골하골에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 면역조직화학법을 이용하여 관찰하였다.(Fig. 7) 정상군과 비교할 때 대조군에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 발현 세포가 현저히 많이 관찰되었다. HP/Z군에서는 대조군에 비하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 발현 세포의 수가 뚜렷이 감소됨을 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

류마티스 관절염은 만성 염증성 자가면역질환의 일종으로 활막의 비후와 임파구의 국소적 침윤을 특징으로 하고 동통, 종창, 강직, 발적, 발열, 운동장애 등의 증상을 나타낸다. 류마티스 관절염의 원인은 확실히 규명되지는 않았으나 비정상적으로 활성화된 임파구가 활막에 침윤하여 만성적으로 관절조직을 파괴하며, 이때 활막세포와 침윤된 세포들이 상호 작용을 통해 임파구

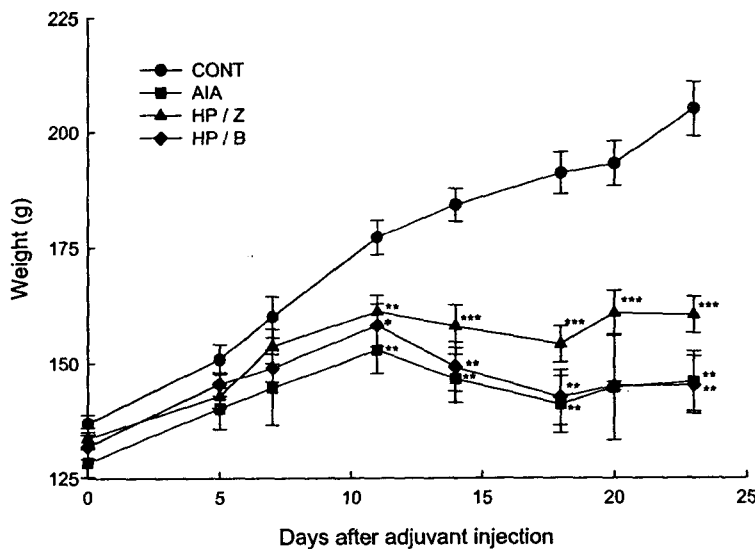


Fig. 2. Effects of Hominis placenta (HP) on body weight of AIA. HP treatment was started day 11 post adjuvant injection and injected once in a day for 15days. HP (0.1ml) was administered into either the Zusanli acupoint (HP/Z) or an arbitrary non-acupoint on the back (HP/B). Non-arthritic (CONT) and arthritic (AIA) groups were injected bilaterally into the ST36 with equal volume of saline. Data were presented as mean  $\pm$  SEM. The differences between groups were assessed by paired t-test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CONT.

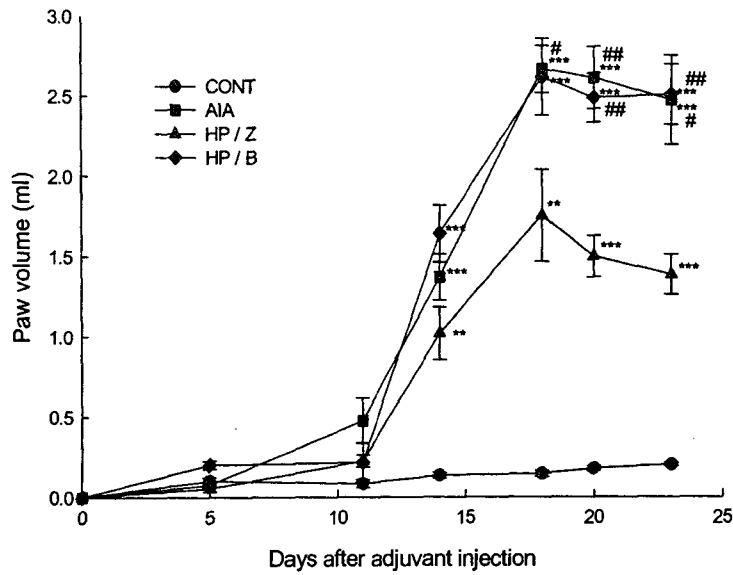


Fig. 3. Effects of Hominis placenta (HP) on paw volume of AIA. HP treatment was started day 11 post adjuvant injection and injected once in a day for 15days. HP (0.1ml) was administered into either the Zusanli acupoint (HP/Z) or an arbitrary non-acupoint on the back (HP/B). Non-arthritic (CONT) and arthritic (AIA) groups were injected bilaterally into the ST36 with equal volume of saline. Data were presented as mean  $\pm$  SEM. The differences between groups were assessed by paired t-test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CONT. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  compared to HP/Z.

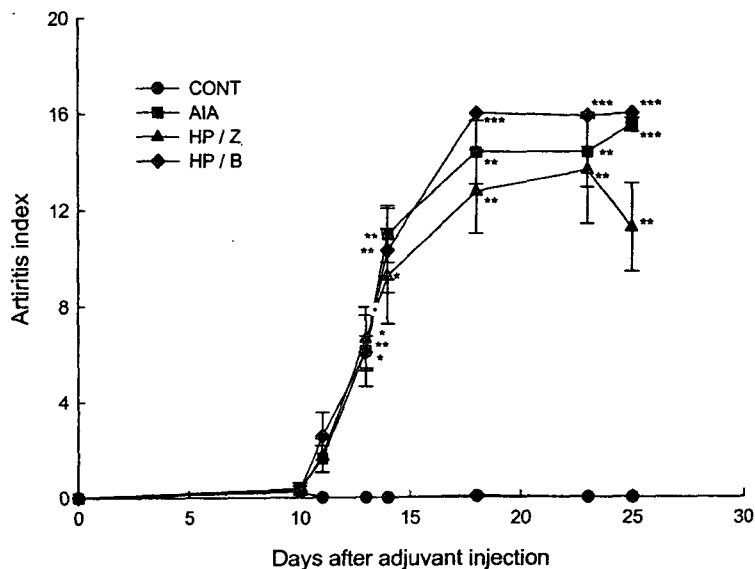


Fig. 4. Effects of Hominis placenta (HP) on arthritis index of AIA. HP treatment was started day 11 post adjuvant injection and injected once in a day for 15days. HP (0.1ml) was administered into either the Zusanli acupoint (HP/Z) or an arbitrary non-acupoint on the back (HP/B). Non-arthritic (CONT) and arthritic (AIA) groups were injected bilaterally into the ST36 with equal volume of saline. Data were presented as mean  $\pm$  SEM. The differences between groups were assessed by paired t-test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CONT.

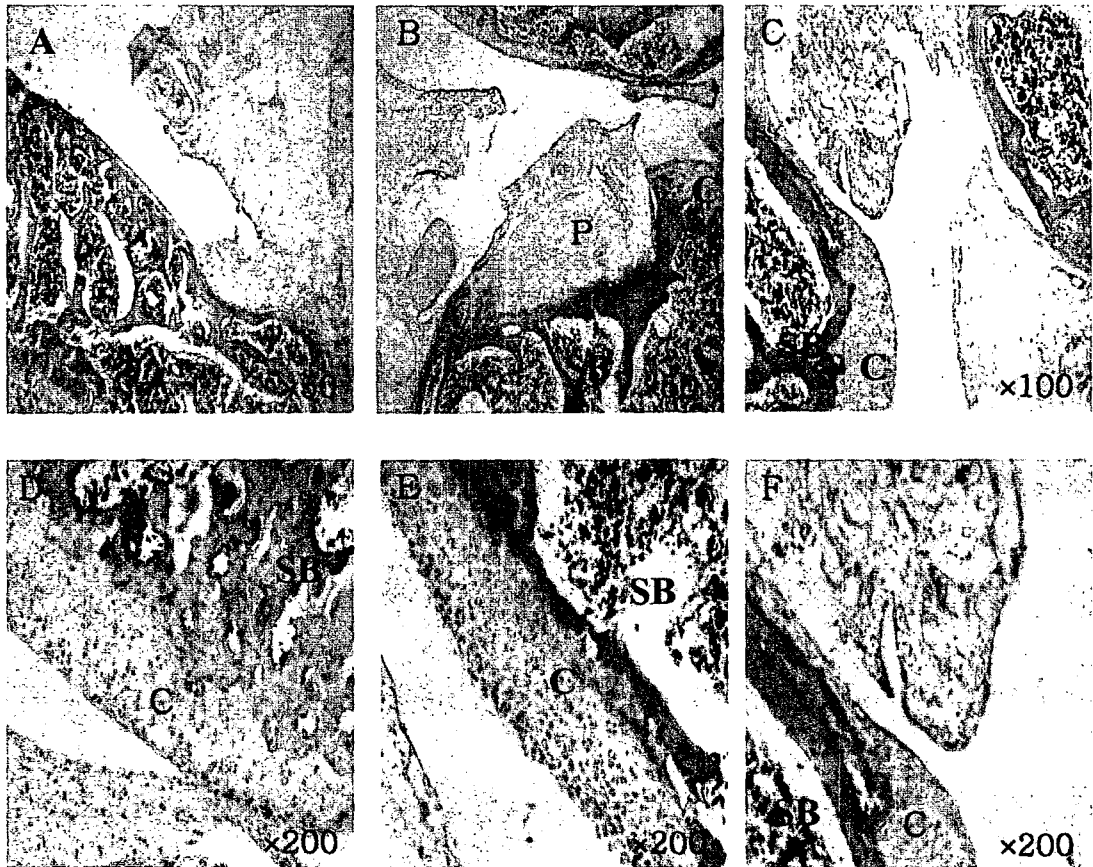


Fig. 5. Histopathological analyses of the knee joints of rats with adjuvant-induced arthritis at day 25. (A, D) Normal joint of non-arthritic group, (B, E) inflamed joint of arthritic group, and (C, F) joint of arthritic group treated with HP. Sections were stained with haematoxylin-eosin. P = pannus; C = cartilage; SB =subchondral bone.



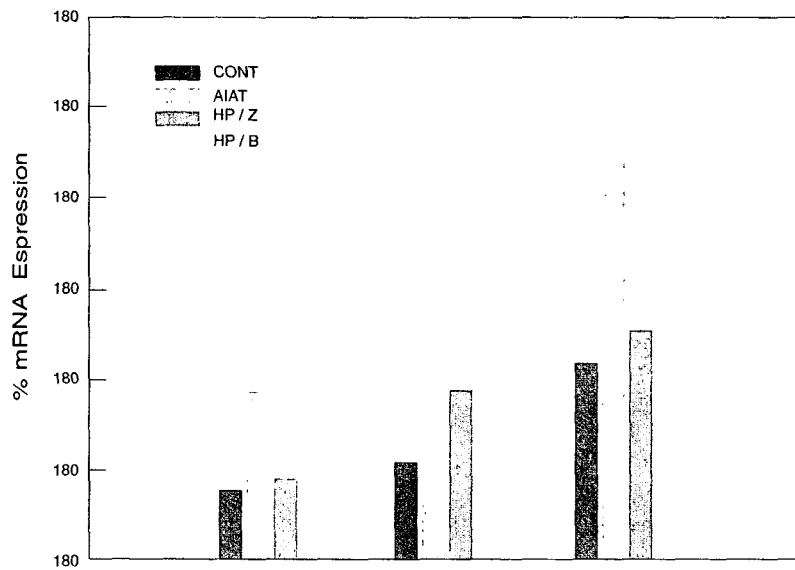
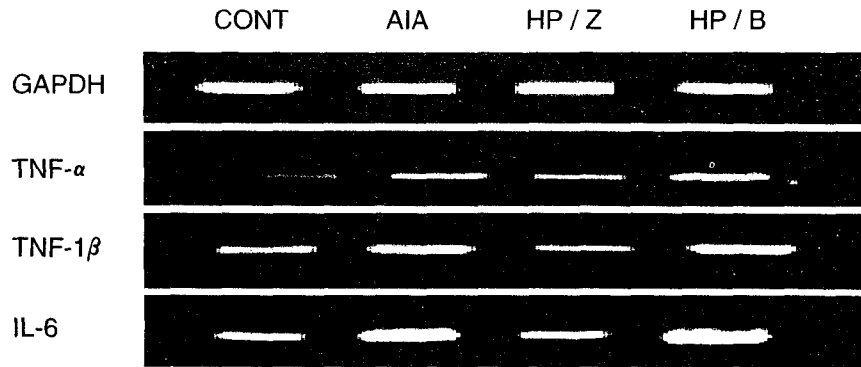


Fig. 6. Expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 6 (IL-6) mRNA in rat with adjuvant-induced arthritis on day 25. Each PCR product was normalized to GAPDH. The observed bands were correlated with the predicted size for GAPDH (579bp), TNF- $\alpha$  (414bp), IL-1 $\beta$  (393bp) and IL-6 (498bp).

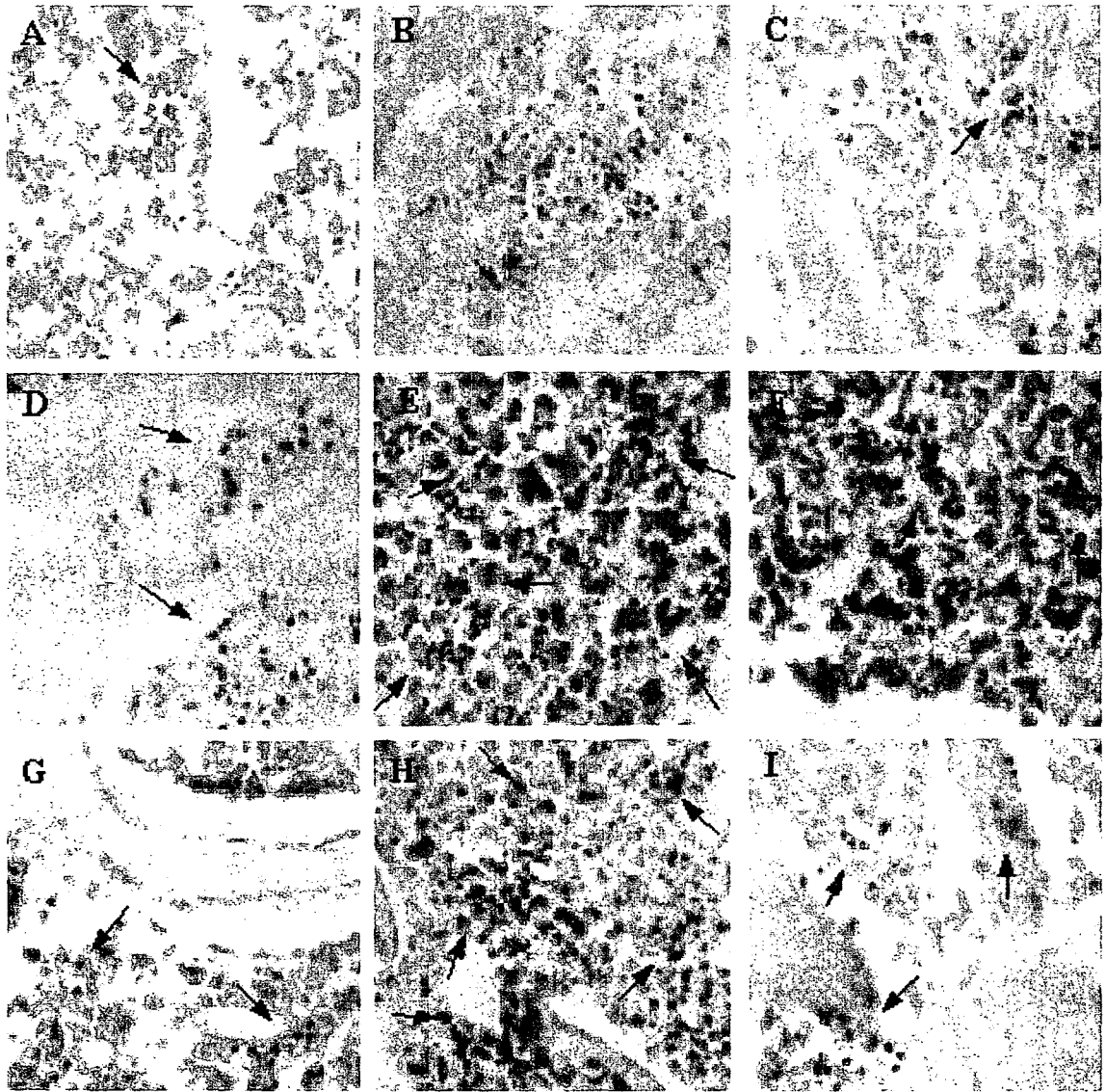


Fig. 7. Immunoreactivities of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in subchondral bone region at day 25. The sections were immunostained with TNF- $\alpha$  (A, B and C), IL-1 $\beta$  (D, E, and F) or IL-6 (G, H and I). (A, D and G), non-arthritic group; (B, E and H), arthritic group; (C, F and I), arthritic group treated with HP to ST36. Original magnification ( $\times 200$ ).

가 추가적으로 침윤되는 것으로 알려져 있다. 또한 원 인불명의 항원이 체내의 항체와 선택적인 결합을 함으로써 자가면역반응이 일어나 면역세포가 축적되는데, 활액막 주위에 활성화된 T-lymphocyte, macrophage, fibroblast, monocyte 등의 침윤이 나타나고, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 cytokine의 발현이 촉진되어 관절조직을 파괴하는 세포성 면역반응과 함께 B-lymphocyte가 관여하여 immunoglobulin의 합성을 증가시키고 활액내 염증, 관절 조직의 파괴, 관절의 변형과 강직이 나타나게 된다. 류마티스 관절염의 일반적인 치료에는 비스테로이드계 소염진통제, 부신피질hormone제, IL-1 과 IL-2 및 T lymphocyte의 활성화를 억제하는 세포독성 억제제 또는 면역억제제가 투여되어 왔으나 최근에는 류마티스 관절염의 발생시 중심적 역할을 하는 활성화된 T-lymphocyte와 염증성 cytokine 억제 및 유착분자 억제 등의 방법이 실험적으로나 임상적으로 많이 연구되고 있다. 그러나 관절염 치료에 사용되는 상기 약물들은 많은 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그러므로 류마티스 관절염의 치료법 개발은 효과적인 증상 완화 기능 뿐 아니라 최소 부작용 및 안전성을 요구한다.<sup>2,3,4, 5,6,7,8,9)</sup>

한의학에서 痺症, 歷節風, 白虎風, 痛風 등에서 류마티스 관절염과 유사한 증상을 설명하고 있다. 歷節病은 <金匱要略><sup>15)</sup>에 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體羸羸, 脚腫如脫”이라 하여 그 증상을 묘사하고 있으며, 고대로 歷節風, 白虎病, 白虎歷節風, 類風濕性關節炎 등으로 표현되고 있으며, 최근 중국에서는 類風濕性關節炎으로 표현하고 있는데 이들은 모두 痺症의 범주에 속하는 것이다. 특히 痺症은 <黃帝內經·痺論><sup>16)</sup>에 “風寒濕三氣難至 合而爲痺也 基風勝者爲行痺 寒氣勝者爲痛痺 濕氣勝者爲着痺”라고 하여 風寒濕 外氣가 痺症의 중요한 원인이라고 언급하고 있으며 그 후에 “飲酒汗出後風寒所致”라 하였고, “血氣가 虛한데 風師를 받은 것”이라 보기도 하였으며, “血虛, 風濕, 風熱, 痰飲, 瘀血”로도 보았고, “內因은 血虛有火로, 外因은 風濕生痰”으로 보았고, “氣血本虛, 飲酒, 勞倦犯房”으로 보았다. 즉 류마티스 관절염은 신체의 기혈과 장부가 내허한 상태에서 六淫之邪가 침입하여 담, 화와 어혈을 생성하여 기육, 관절을 저체(沮滯)하여 기혈 순행이 순조롭지 못하여 발생된다고 설명하며, 그 치료에 있어서 祛風清熱, 利濕, 行氣活血, 補肝腎, 消風經絡 등의 방법을 운용한다고 알려져 있고, 치료 방법으로 약물요법, 구요법 및 약

침요법 등을 사용하는 것으로 보고되고 있다<sup>17)</sup>.

약침요법이란 침의 자극과 약물의 자극을 동시에 가하여 보다 양호한 치료효과를 얻고자 함을 목적으로 특정질환에 유효한 약물이거나 처방을 선용하여 약침액으로 만들어 일정한 경혈, 압통점 및 피부의 양성반응점에 주입함으로써 생리적인 기능을 강화시키고 병리적인 상태를 개선시키는 신침요법의 하나로 수침요법, 혈위주사요법이라고도 한다.

본 실험의 약침제제로 사용한 자하거 (Hominis placenta)는 사람의 태반을 건조한 것으로, 그 성미는 甘, 鹹, 溫, 無毒하며, 귀경은 폐, 비, 간, 비경이라 하였다. 그 공효는 대부분 虛損을 補益하고 氣血과 情을 補한다고 하였다. 주치는 주로 虛損으로 인한 血氣羸瘦, 面皮黑, 癩癩, 失志恍惚, 五勞七傷, 骨蒸潮熱, 盜汗, 腰痛膝軟, 夢遺, 陽痿, 不孕, 婦人勞損, 耳鳴, 頭目眩暈, 面色萎黃, 倦怠無力, 肺虛咳嗽, 咳血 등이라고 하였다. 자하거에는 간세포증식인자(HGF), 상피세포증식인자(EGF), 신경세포증식인자(NGF), 코로니 형성자극인자(CSF), 각종 interleukin, 각종 interferon 등 각종 세포증식인자가 있는 것으로 밝혀져 있고, 아울러 혈액응고인자와 성선자극호르몬, prolactin, 갑상선 자극 호르몬, 스테로이드 호르몬, prostaglandin과 lysozyme, kininase, histaminase 등과 같은 각종 효소, erythropoietin, 인지질 및 각종 다당류 등을 함유하고 있다<sup>18)</sup>. 임상적으로 자하거 약침은 만성 피로, 만성 간염·류마티스 관절염과 같은 만성 질환 등에 이용되고 있다. 그러나 아직까지 자하거 약침의 효능에 대한 실험적 연구가 이루어지고 있지 못하여 본 연구에서는 관절염이 유발된 흰쥐의 무릎 관절에서 자하거 약침의 항염증 효과를 증명하고 있다.

본 실험에서는 흰쥐의 adjuvant 관절염에 대한 자하거 약침의 효과를 관찰하기 위하여 관련 깊고 비교적 명확한 취혈이 가능한 경혈로 족삼리를 선택하였다. 족삼리는 足陽明胃經의 合穴로 理脾胃, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病, 強健脾胃하는 혈성이 있어 痛風, 坐骨神經痛, 脚氣, 膝關節痛, 膝無力, 中風半身不隨, 下肢痛 등의 주치로 한다<sup>19)</sup>. 여러 실험 보고에서도 관절염, 신경병리성 동통, 증풍 등의 동물 모델에서도 우수한 효과가 있음을 보여주었다.

관절염 유발 후 나타나는 체중 감소, 관절의 부종 및 발적과 같은 임상적 증후가 발병 초기부터 족삼리에 자하거 약침을 처리한 결과 대조군에 비하여 뚜렷이 완화되었다. 외형적 증후뿐만 아니라 관절염이 유발된

관절 내에서 관찰되는 면역세포라 추정되는 많은 세포의 침윤과 관절 부식 및 pannus의 형성이 대조군에 비하여 미미하였다.

자하거 약침의 항염증 효과를 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6을 지표로 선정하였다. 기존의 보고 내용에 따르면, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 다른 proinflammatory signal molecule들의 발현을 촉진시켜 연골 파괴를 야기시키고, 연골 단백질의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>5,20,21,22</sup>. TNF- $\alpha$ 는 관절염의 초기에 중요한 역할을 하는 반면, IL-1 $\beta$ 는 초기 뿐 아니라 후기까지 꾸준히 관여한다. 또한 염증 반응에 주요한 역할을 하는 TNF- $\alpha$ 와 달리 IL-1 $\beta$ 는 연골이나 뼈의 부식에 주요한 역할을 한다. IL-6은 다기능 cytokine으로서 관절 내 염증 반응을 촉진시키기도 하고 억제시키기도 하며 침윤한 염증세포의 증식에 중요한 역할을 한다<sup>23</sup>. 실제로 관절염 동물 모델의 관절 조직이나 관절염 환자의 관절 내에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현이 증가된다는 것은 이미 보고된 바 있다<sup>20</sup>. 본 실험에서도 관절염을 유발 후 슬관절 내에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA와 단백질의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 발현 증가는 자하거 약침 치료 결과 현저히 감소하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 자하거 약침은 류마티스 관절염 동물모델에서 보여지는 관절의 염증을 억제하는데 있어 효과적임을 알 수 있었다. 또한 비혈위에 약침액을 주사한 HP/B군은 체중감소, 부종 및 발적의 양상이 대조군과 매우 유사했으며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA와 단백질의 발현 정도는 오히려 대조군보다 다소 증가함을 보임에 따라 침 자극과 약물 자극을 동시에 가하여 보다 양호한 치료효과를 얻을 수 있다는 약침 요법의 우수성을 실험적으로 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 자하거 약침이 류마티스 관절염 동물 모델의 염증반응을 억제하는 것이 관찰되어 류마티스 관절염 초기 치료에 응용 가능하리라 생각되며, 앞으로 류마티스 관절염의 면역기전에 대한 다양한 억제 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

관절염에 대한 자하거 약침의 효과를 알아보기 위하여 흰쥐의 adjuvant 관절염 모델을 이용하여 체중감소, 부종 및 발적과 같은 임상적 증상과 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6

mRNA와 단백질의 발현 정도를 살펴본 실험의 결과는 다음과 같다.

1. Squalane에 유화시킨 *Mycobacterium tuberculosis* H37RA를 흰쥐의 꼬리 기저부에 피내 주사에 시켜 만든 흰쥐의 adjuvant 관절염 동물 모델은 대다수의 동물에서 체중감소와 부종 및 발적이 다발적으로 나타났다.
2. 임상적 지표의 변화에 있어서 자하거 약침이 체중감소와 부종 및 발적을 유의하게 억제하였다.
3. 대조군과 비교할 때 자하거 약침은 관절 내에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 발현을 정상군 수준으로 감소시켰다.
4. 대조군과 비교할 때 자하거 약침은 관절 내 연골하골에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 단백질의 발현을 정상군 수준으로 감소시켰다.
5. 비혈위에 자하거 약침액을 주사한 경우에는 관절 내의 염증 억제 효과를 나타내지 못했다.

이상의 결과와 같이 관절염 유발 직후부터 실시한 자하거 약침 치료가 흰쥐의 adjuvant 관절염 동물 모델의 염증 반응을 억제하는 것이 관찰됨에 따라 류마티스 관절염 초기 치료에 응용 가능하리라 생각되며, 앞으로 류마티스 관절염의 면역기전에 대한 다양한 억제 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 참고 문헌

1. Lee YH, Choi SJ, Kim A, Kim CH, Ji JD, Song GG. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in rheumatoid arthritis synovium. J Korean Med Sci. 2000; 15: 88-92.
2. Woods JM, Katschke KJ, Volin MV, Ruth JH, Woodruff DC, Amin MA, Connors MA, Kurata H, Arai K, Haines GK, Kumar P, Koch AE. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. J Immunol. 2001; 166(2): 1214-1222.

3. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*. 2001; 90(3): 271-280.
4. de Hooge AS, van De Loo FA, Arntz OJ, van Den Berg WB. Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. *Am J Pathol*. 2000; 157(6): 2081-2091.
5. Cai L, Yin J, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS, Filvaroff EH. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine*. 2001; 16(1): 10-21.
6. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 397-440.
7. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10(3): 256-262.
8. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10(3): 256-262.
9. Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol*. 1998; 37(5): 546-554.
10. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編著 外. 鍼灸學 上, 下. 서울: 集文堂. 1988.
11. 上海中醫學院: 鍼灸學, 香港, 商務印書館, 1982.
12. 대한약침학회 : 약침요법시술지침서. 서울: 대한약침학회 2000.
13. Leech M, Metz C, Bucala R, Morand EF. Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(4): 827-833.
14. Santos LL, Morand EF, Hutchinson P, Boyce NW, Holdsworth SR. Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1997; 107(2): 248-254.
15. 張仲景 : 金匱要略方論, 北京, 人民衛生出版社, 1972.
16. 張馬合註 : 黃帝內經 素問, 臺北, 大聯國風出版社, 1973.
17. 朴鍾國 : 鍼灸治療學. 서울. 集文堂, 1983.
18. 이상길, 이재동, 고희균, 박동석, 이윤호, 강성길: 자하거 약침제제에 관한 고찰, 대한약침학회지, 2000 17(1) 67-74.
19. 朴慶堯 : 자침이 류마티스성 관절염에 미치는 효과, 대한동의병리학회지 1998, 12(2); 49-54.
20. Kuiper S, Joosten LA, Bendele AM, Edwards CK 3rd, Arntz OJ, Helsen MM, Van de Loo FA, Van den Berg WB. Different roles of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis. *Cytokine*. 1998; 10(9): 690-702.
21. Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res*. 1999; 1(1): 81-91.
22. van den Berg WB, Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 1999; 13(4): 577-597.
23. Deon D, Ahmed S, Tai K, Scaletta N, Herrero C, Lee IH, Krause A, Ivashkiv LB. Cross-talk between il-1 and il-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol*. 2001; 167(9): 5395-5403.
24. Carteron NL. Cytokines in rheumatoid arthritis: trials and tribulations. *Mol Med Today*. 2000; 6(8): 315-323.