

원저

柴胡藥鍼이 생쥐의 Adjuvant 誘發 關節炎에 미치는 영향

구민숙 · 윤종화 · 김경호 · 장준혁 · 이승덕 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Bupleuri Radix Herbal-acupuncture Solution on Immune Responses to Adjuvant Induced Arthritis in Mice

Min-Suck, Koo · Jong-Hwa, Yoon · Kyoung-Ho, Kim · Jun-Hyeok, Jang
Sung-Deck, Lee · Kap-Sung, Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Dong-Guk University (Direted By Prof. Kap-Sung, Kim O.M.D Ph.D.)

Objective : The purpose of this study is to investigated that effect of *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution (BRHS) on the cellular immune response in mice with adjuvant induced arthritis, performed several experimental items : those are paw edema, IL-1 β , IL-6, IL-8, PNF- α and PGE₂.

Methods : All the male Sprague Daeley mice used in this study were bred and maintained in our pathogen-free mouse colony and were 8 weeks of age at the start of the experiment. The experimental model of arthritis was induced by injection of 50 μ g/ μ l adjuvant(mineral oil mixed *Mycobacterium butyricum*). *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution (BRHS) was injected into ST₃₆(足三里) of mice daily for 21 days. Immunohistological analysis was carried out to assess paw edema, IL-1 β , IL-6, IL-8, PNF- α and PGE₂ expression in synovial membrane and sera *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution(BRHS) injected.

Results : At day 21 post arthritis onset, immunohistological studies using monoclonal antibodies showed that *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution (BRHS) group had decreased expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, PNF- α and PGE₂ at inflammatory cytokines production and edema compared with control group.

- 접수 : 2002년 3월 9일 · 수정 : 5월 9일 · 채택 : 2002년 5월 18일
· 교신저자 : 김갑성, 경북 경주시 용강동 357, 동국대 경주한방병원 침구과(Tel. 054-770-1558)
E-mail : kapsung@unitel.co.kr

Conclusion : *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution (BRHS) inhibited inflammatory cytokines production and edema in adjuvant induced arthritic mice. Thus, Herbal-acupuncture solution may have prevention.

Key words : *Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution, arthritis, cellular immunity

I. 緒論

關節은 筋의 機能的 發現의 聚合處이며 屈伸, 內外轉 및 回轉등을 담당하는 운동기관¹⁾으로써, 여러 가지 원인에 의한 炎症性 病變이 일어나 疼痛, 腫脹, 強直, 發赤, 發熱, 運動障礙가 나타나는 질환을 關節炎이라 한다²⁾.

關節炎 患者의 炎症部位의 滑膜細胞에서는 proinflammatory cytokine의 일종인 interleukin-1 β (IL-1 β)의 上昇³⁾과 이로 인한 磷脂質의 變換 그리고 arachidonic acid 대사과정에 관련된 酵素界의 活性化⁴⁾ 및 관련된 prostaglandin의 生成 增加 등 다양한 因子들⁵⁾이 관련되어 있다.

현재 關節炎 研究를 위한 動物 實驗的 研究로는 collagen 誘發 關節炎(Collagen-induced arthritis, CIA)⁶⁾과 adjuvant 誘發 關節炎⁷⁾ 등의 방법이 있으며 이중 adjuvant 誘發 關節炎은 關節炎 浮腫의 연구모델로서 이용되고 있다.

최근 韓醫學의 治療法 經絡學說의 原理에 근거하고 韓藥의 特性을 이용하여 人體의 經穴 및 壓通點에 藥鍼液을 주입하여 刺針效果와 藥物作用을 통하여 질병을 치료하는⁸⁾ 藥鍼療法이 關節炎 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다.

Adjuvant 誘發 關節炎에 대한 關聯藥鍼 研究로는 草龍膽⁹⁾, 草烏¹⁰⁾, 牛膝¹¹⁾, 續斷¹²⁾ 등을 adjuvant 誘發 關節炎에 유효하다고 보고하였으나

柴胡를 藥鍼으로 사용하여 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 炎症抑制 및 炎症傳達物質의 生成에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 생쥐의 關節에 adjuvant로 關節炎을 誘發시키고 和解退熱의 效能이 있는 柴胡(*Bupleurum falcatum* Linne.)¹³⁾를 材料로 한 藥鍼液(*Bupleuri Radix* Herbal-acupuncture solution)을 膝關節痛, 四肢浮腫 등의 증상에 효능이 있는 足三里(ST₃₆)⁸⁾에 投與하여 炎症性 cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 變化 및 synovial fluid에서 prostaglandin E₂(PGE₂)의 變化를 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

胎齡 8주된 Sprague Dawley계 雄性 생쥐(효창 사이언스, 대구, 대한민국)를 22 \pm 2 $^{\circ}$ C 온도와 40~60% 습도가 유지되는 조건으로, 감염을 방지하고자 無菌飼育裝置內에서 일주일 이상 적응시킨 후 체중 130g 내외의 것을 實驗에 사용하였다.

2) 藥材

實驗에 사용한 柴胡 (*Bupleuri Radix*)는 東國大學 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 사용중인 정선

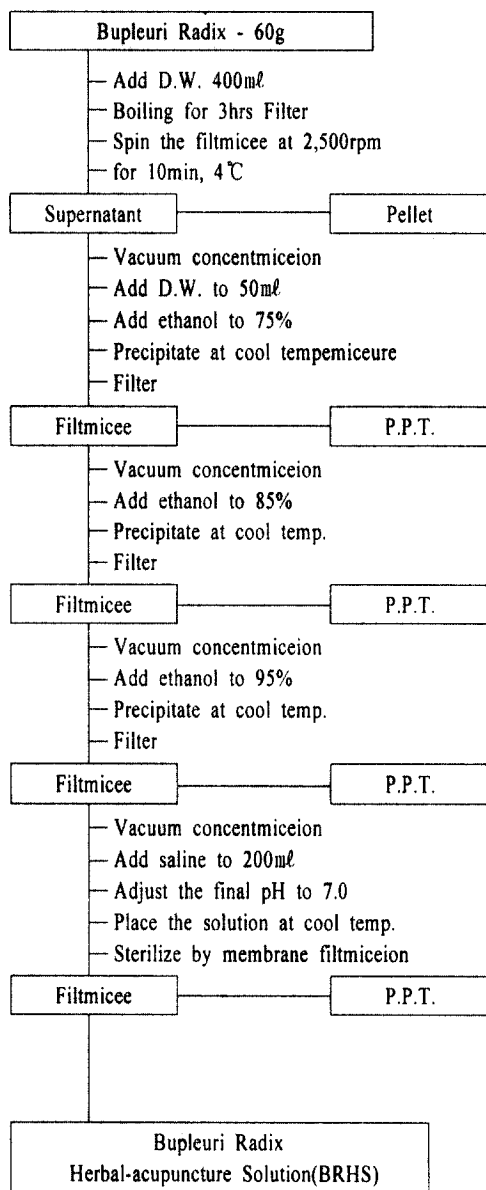
한 柴胡를 사용하였으며 3次 蒸溜水를 추출에 사용하였다.

3) 柴胡藥鍼(BRHS)의 製造

본 實驗에서는 水劑-Alcohol沈法¹⁴⁾에 의해 다음과 같이 柴胡藥鍼을 製造하였다. 먼저 柴胡 60g을 수직으로 환류냉각관이 부착된 圓底flask에 넣고, 蒸溜水 400ml를 가한 후, 3시간 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 그 후 濾過液 중에 남아 있는 微量의 침전물을 제거하기 위해 4℃에서 2,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여, 그 上層液을 취하였다. 上層液을 다시 rotary evapomiceor(BUCHI RE121, Switzerland)로 減壓濃縮하고, 濃縮液에 蒸溜水를 가하여 全量을 50ml가 되도록 한 다음, membrane filter(0.22 μ m, Whatman[®], Germany)로 濾過하였다. 위의 방법으로 製造한 柴胡抽出液 50ml에 ethanol을 가하여 攪拌하고 저온에서 방치하여 生成된 침전물을 餘別하였다. 이 때 ethanol은 99.9% ethanol을 사용하였으며, 첨가량은 柴胡抽出液이 단계별로 75%, 85% 및 95% ethanol 용액이 되게 하면서 침전물을 제거한 다음, 減壓濃縮하였다. 減壓濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 가하고 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절하여 全量이 200ml가 되게 한 다음 저온에서 24시간 방치한 후, membrane filter(0.22 μ m, Whatman[®], Germany)로 濾過하여 柴胡藥鍼의 源液($\times 1$)으로 사용하였으며 필요에 따라 0.5倍 濃度($\times 0.5$) 및 2倍 濃度($\times 2$)로 하여 사용하였다 (Scheme 1).

4) 試藥 및 機器

Adjuvant는 熱-弱화시킨 Mycobacterium bytyricium(Difco Labomiceory, Detroit, MI)을, 그 외의 모든 試藥들은 特級製品을 사용하였고, IL-1 β 및 IL-6의 定量에 사용한 3종류의 抗體(ON-1, NY-2, YB-3) 및 polyclonal antibody들은 東國大學校 醫科大學 藥理學教室로부터, TNF- α



Scheme 1. Prepmiceion of Bupleuri Radix Herbal-Acupuncture Solution(BRHS)

및 IL-8의 定量에는 R&D systems社(Minneapolis, MN, U.S.A.)로부터, prostaglandin E₂(PGE₂) 측정 에 사용한 試藥인 enzyme immunoassay kit는 Cayman Chemical社(Ann Arbor, MI, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1 Classification of Experimental Groups

實驗그룹		마리	적용부위	投與량/mice	기간
正常群(Normal)		5			21일
Adjuvant 誘發群(對照群, Control)		5	足三里(ST ₃₆)	0.4ml	21일
實驗群	0.5倍藥鍼刺戟群(×0.5)	5	足三里(ST ₃₆)	0.4ml	21일
	1倍藥鍼刺戟群(×1)	5	足三里(ST ₃₆)	0.4ml	21일
	2倍藥鍼刺戟群(×2)	5	足三里(ST ₃₆)	0.4ml	21일
	任意穴刺戟群(Blank locus)	5	任意穴(尾椎部)	0.4ml	21일

實驗에 사용한 機器로서는 rotary evaporator는 BUCHI社(BUCHI RE121, Switzerland)로부터, CO₂ 배양기는 Vison社(Vision Biotech, VS-9180, Korea)로부터, UV spectrophotometer는 Gilford社(Gilford, Response™, U.S.A.)로부터, ELISA reader는 Molecular Devices社(VERSA max, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 取穴

생쥐의 經穴은 인체와 달리 그 부위가 애매하여 解剖學的으로 인체의 足三里(ST₃₆)⁸⁾에 상응하는 부위의 털을 제거한 후 骨度分寸法으로 取穴하였다.

2) 實驗群의 分類 및 處置

實驗動物은 생쥐 5마리를 1群으로 하여 無處置한 正常群(Normal), adjuvant 關節炎 誘發후 生理食鹽水를 투여한 對照群(Control), 足三里(ST₃₆)와 ×0.5, ×1, ×2의 농도를 각각 投與한 實驗群으로 分類하였으며 投與용량은 1회 400μl씩 주입하였다.

3) 關節炎의 實驗的 誘發¹⁵⁾

關節炎을 誘發시키기 위해 熱-弱화시켜 건조한 Mycobacterium butyricum를 mineral oil에 현탁시킨 액(adjuvant)을 생쥐의 오른쪽 발에 1회 皮下注射(50μg/50μl/mice)하였다. 實驗은 한그룹당 5마리의 생쥐를 사용하였으며 對照群으로는 mineral oil만을 사용하여 같은 방법으로 오른쪽 발에 주사

하고 柴胡藥鍼 대신 생리식염수(0.9% NaCl 용액)를 投與하였다.

4) Synovial fluid의 採取

생쥐의 부어오른 關節로부터 synovial fluid의 採取는 멸균된 insulin syringe(SHINA Co., Seoul, Korea)를 사용하여 eppendrop tube에 모아 6,000 rpm에서 30분간 원심분리한 뒤 上層液을 희석하여 prostaglandin E₂의 측정에 사용하였다.

5) Paw volume의 測定¹⁶⁾

生成된 浮腫의 용적은 adjuvant를 投與하기 직전에 측정된 volume을 control volume(day 0)으로 하였으며 data는 매일 같은 시각에 측정된 volume을 control volume과 비교하여 percentage로 나타내었다. 測定에는 plethysmometer(UGO, Basil, Italy)를 사용하였다.

6) Interleukin-1β의 濃度測定

생쥐의 혈청 속의 IL-1β의 양은 sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)法¹⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 즉 anti-IL-1β polyclonal antibody(5μg/ml)를 96 well plate에 PBS buffer를 이용하여 미리 over night로 흡착시켜 놓는다. 생쥐 혈청을 PBS buffer로 희석한 다음 50μl씩 plate에 가한 다음 실온에서 1시간 배양시킨다. 그 후 96 well plate를 0.05% Tween-PBS로 3회 세척하고 그 위에 biotin화시킨 anti-IL-1β

monoclonal antibody(ON-1, IgG_{2b}, 5 μ g/ml)를 다시 가하여 1시간 배양한다. 3회 세척한 후 horse radish peroxidase(HRP) conjugated streptavidin을 가하여 1시간 反應 시킨 후, o-phenylenediamine을 기질로 하여 492nm에서 吸光度를 측정하였다.

7) Interleukin-6의 量測定

생쥐의 血清속의 IL-6의 양은 Nam 등¹⁸⁾이 확립한 sandwich ELISA 法을 이용하여 측정하였다. 즉 anti-IL-6 monoclonal antibody(NY-2, IgM, 5 μ g/ml)를 96 plate well에 PBS buffer를 이용하여 미리 over night로 흡착시켜 놓는다. 그리고 희석한 血清을 50 μ l씩 plate에 가한 다음 실온에서 1시간 배양시킨다. 그 후 well plate를 0.05% Tween-PBS로 3회 세척하고 그 위에 biotin화시킨 anti-IL-6 monoclonal antibody(YB-3, IgG1, 5 μ g/ml)를 다시 가하여 1시간 배양한다. 3회 세척한 후 horse radish peroxidase(HRP) conjugated streptavidin을 가하여 1시간 反應시킨 후, o-phenylenediamine을 기질로 하여 492nm에서 吸光度를 측정하였다.

8) Interleukin-8의 量測定¹⁹⁾

IL-8의 濃度측정에 사용한 enzyme immuno-assay kit는 R&D systems社(R&D System, Minneapolis, Minn)의 제품을 사용하였다. 먼저 각각의 group으로부터 희석한 血清 50 μ l를 anti-IL-8 polyclonal antibody가 coat되어 있는 well에 넣은 다음 실온에서 2시간 배양한다. 그 후 well plate를 세척하고 peroxidase conjugated secondary antibody를 100 μ l 가한다. 다시 실온에서 2시간 배양 후 세척한 다음 peroxidase의 기질시약을 100 μ l 가한 다음 450 nm에서 吸光度를 측정한 뒤 檢量曲線과 비교하여 定量하였다.

9) Tumor necrosis factor- α 의 濃度測定²⁰⁾

TNF- α 의 濃度測定에 사용한 enzyme immunoassay kit는 R&D system社(R&D System, Minneapolis, Minn)의 제품을 사용하였다. 희석혈청 50 μ l를 anti-TNF α monoclonal antibody가 coat되어 있는 well에 넣은 다음 실온에서 2시간 배양한다. 그 후 well plate를 10mM phosphate buffered saline(pH 7.4)-0.05% Tween 20으로 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated secondary antibody를 100 μ l 가한다. 다시 실온에서 2시간 배양 후 세척한 다음 phosphatase의 기질시약 {1 mg of disodium p-nitrophenyl phosphate, 1ml of 1M diethanolamine buffer(pH 9.5) containing 0.5mM MgCl₂}을 100 μ l 가한 다음 405 nm에서 吸光度를 측정한 뒤 檢量曲線과 비교하여 定量하였다.

10) Prostaglandin E₂의 濃度測定

Enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical社, U.S.A.)를 사용하여 Synovial fluid으로 부터 PGE₂의 양을 측정하였다.²¹⁾ 즉, synovial fluid를 3,000rpm에서 원심분리하고 上層液을 이용하여 PGE₂의 함량을 측정하였다. 그 방법은 먼저 EIA buffer를 비특이적 결합(NBS)을 한 well에 첨가하고, 50 μ l의 buffer를 최대결합(B₀)을 한 well에 첨가하였다. 50 μ l의 PGE₂ standard (7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml)나 EIA buffer로 희석한 상층액 sample을 각 well에 첨가하였다. 50 μ l의 PGE₂ acetylcholin-esterase tracer를 total activity와 blank well을 제외한 각각의 well에 넣고, 50 μ l의 anti-PGE₂ monoclonal antibody를 total activity(TA)와 비특이적 결합(NSB)그리고 blank(B) well을 제외한 각각의 well에 넣었다. 플라스틱 필름으로 plate를 덮고 40C에서 18시간 反應시켰다. 그리고 wash buffer로 5 μ l 세척한 후, 200 μ l의 Ellman's 시약을 각각의 well

에 첨가하고 5 μ l의 tracer를 total activity well에 넣었다. Plate를 plastic film으로 덮고 60~90분 동안 develop시킨 후 405nm에서 吸光度를 읽었다.

11) 統計處理

본 實驗에서 얻은 實驗群 간의 결과에 대하여 Student's t-test를 실시하여 有意性を 검정하였으며, p값이 0.05이하인 경우에 有意性を 인정하였다.

III. 實驗成績

1. Paw volume의 測定

각 濃度別 柴胡藥鍼의 足三里(ST₃₆) 投與로 adjuvant 投與 후 實驗群의 제 1일~제 9일 사이에는 對照群에 비하여 별다른 抑制를 나타내지 못했다. 그러나 제 21일에서는 對照群에 비해 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 의 濃度에서는 36.8%, $\times 1$ 의 濃度에서는 52.6%, 그리고 $\times 2$ 의 濃度에서는 54.7%의 抑制效果를 보임으로써 기간별, 濃度依存的 抑制效果가 나타났다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)에서는 柴胡藥鍼($\times 1$) 投與群에서도 31.6%의 抑制效果를 나타내었다(Fig. 1).

Fig 1. Effects of BRHS on adjuvant induced arthritis in mice

2. Interleukin-1 β 의 生成에 미치는 效果

對照群은 正常群에 비하여 3.2배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 23.5%로 有意性(p<0.05) 있는 抑制效果가 보였고, $\times 1$ 에서 42.2%, $\times 2$ 에서 44.1%로 각각 매우 현저한 有意性(p<0.005)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 16.7%의 抑制效果가 나타났다(Fig. 2).

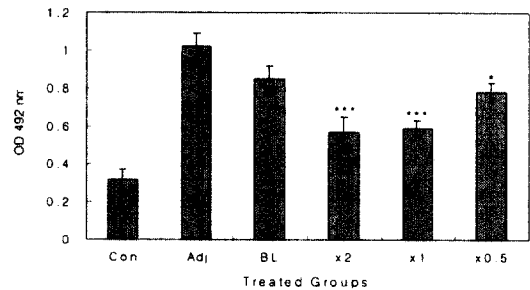


Fig 2. Effect of BRHS on IL-1 β production in mice sera of adjuvant induced arthritis Data shown are mean values with bars indication the standard deviations of the mean(n=3). *p<0.05, ***p<0.005 as compared with adjuvant(Adj)

3. Interleukin-6의 生成에 미치는 效果

對照群은 正常群에 비하여 2.9배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 21.0%로 有意性(p<0.05) 있는 抑制效果가 보였고, $\times 1$ 에서 28.4%, $\times 2$ 에서 39.5%로 각각 현저한 有意性(p<0.01)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 16.0%의 抑制效果가 나타났다(Fig 3).

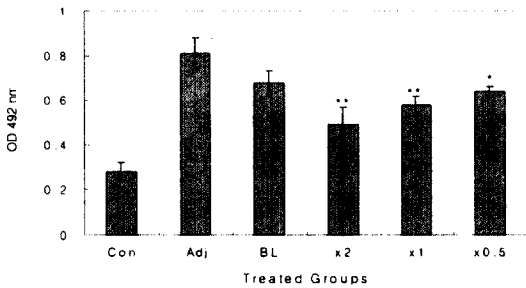


Fig 3. Effect of BRHS on IL-6 production in mice sera of adjuvant induced arthritis The values are expressed as the mean±SD(standard deviation) of three experiments. *p<0.05, **p<0.01 as compared with adjuvant(Adj) group.

4. Interleukin-8의 생성에 미치는 효과

對照群은 正常群에 비하여 10.9배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 ×0.5에서 11.9%의 억제효과가 보였고, ×1에서 19.8%로 有意性(p<0.05) 있는 억제효과가 보였고, ×2에서 28.2%로 현저한 有意性(p<0.01)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 16.3%로 抑制效果가 나타나 柴胡藥鍼 투여 ×0.5 농도보다 억제효과가 크게 나타났다. 對照群에서 1090% 증가를 고려할 때 약침의 투여로 인한 억제효과는 크지 않았다 (Fig 4).

Fig 4. Effect of BRHS on IL-8 production in mice sera of adjuvant induced arthritis Data shown are mean values with bars indicating the standard deviations of the mean(n=3). *p<0.05, **p<0.01 as compared with adjuvant(Adj) group.

5. Tumor necrosis factor- α 의 생성에 미치는 효과

對照群은 正常群에 비하여 6.2배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 ×0.5에서 16.1%로 억제되었으며, ×1에서 32.3%, ×2에서 51.6%로 각각 매우 현저한 有意性(p<0.005) 있는 억제효과를 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 12.9%의 抑制效果가 나타나 ×0.5의 농도와 비슷한 정도로 억제시키는 것으로 나타났다(Fig 5).

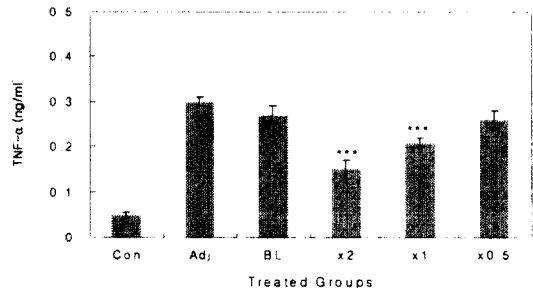


Fig 5. Effect of BRHS on TNF- α production in mice sera of adjuvant induced arthritis The values are expressed as the mean±SD(standard deviation) of three experiments. ***p<0.005 as compared with adjuvant(Adj) group.

6. Prostaglandin E₂의 생성에 미치는 효과

對照群은 正常群에 비하여 4.0배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 ×0.5에서 26.2%로 有意性(p<0.01) 있는 억제효과가 보였고, ×1에서 44.1%, ×2에서 39.3%로 각각 매우 현저한 有意性(p<0.005)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)에서도 26.2%의 억제효과가 나타났다(Fig. 6).

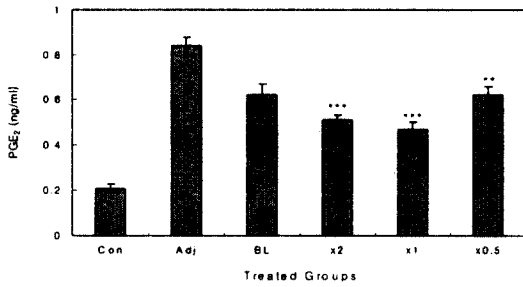


Fig 6. Effect of BRHS on PGE₂ production in mice Synovial fluid of adjuvant induced arthritis

The values are expressed as the mean±SD(standard deviation)of three experiments. ..p<0.01, ...p<0.005 as compared with adjuvant(Adj) group.

IV. 考察

東洋醫學에서 關節炎은 痛痺, 歷節風, 痛風, 鶴膝風, 白虎風 等の 範疇에 속하는 것²²⁾으로 이들 병증의 原因으로 《素問》²³⁾에서는 風寒濕을, 張²⁴⁾은 飲酒 汗出後 風邪所致로, 蘇²⁵⁾는 血氣가 虛한데 風邪를 받은 것이라 하였으며, 朱²⁶⁾는 血虛 風濕 風熱 痰飲 瘀血로 보았고, 李²⁷⁾는 內因으로 血虛有火 外因으로 風濕生痰으로, 또한 張²⁸⁾은 氣血本虛 飲酒 勞倦犯房을 原因으로 보았다.

關節炎은 關節의 炎症性 病變으로 疼痛 強直 腫脹 發赤 發熱 運動障礙 等の 증상이 나타나는 질환을 말한다. 原因은 外傷, 感染, 代謝異常, 免疫異常, 腫瘍 等이 있지만 原因不明인 경우도 많다. 이러한 증상은 病變이 있는 軟骨과 支持組織 또는 滑膜組織 疾患으로부터 생기는 것이며 가장 대표적인 질환 중의 하나로 류마티드 關節炎을 들 수 있다²⁹⁾.

또한 關節炎 환자의 炎症部位의 滑膜細胞에서는 proinflammatory cytokine의 일종인 interleukin-1β(IL-1β)의 상승³⁾과 이로 인한 磷脂質의 turn over 그리고 arachidonic acid 대사과정에 관련된

酵素界의 활성화⁴⁾ 및 관련된 prostaglandin의 生成 增加 등 다양한 因子들⁵⁾이 관련되어 있는 것으로 나타나 있다.

關節炎 연구를 위한 動物實驗 모델로 대표적인 것은 collagen 誘發 關節炎(Collagen-induced arthritis, CIA)³⁰⁾과 adjuvant 關節炎³¹⁾으로, 그 중 adjuvant 關節炎은 實驗動物의 皮膚에 結핵菌의 유성 懸液인 Freund's complete adjuvant를 주사 하면 사람의 rheumatoid 關節炎에서도 서로 交叉反應하는 항체가 발현되고 있는 peptidoglycan 성분으로 알려진 誘發因子에 의하여 2주후에 多發性 關節炎 및 脾臟과 副腎의 腫大, 體重減少, 白血球 增加 等の 전형적인 증상이 국소 및 전신에 발현되는 데, 그 유사성으로 인하여 인체의 rheumatoid 關節炎 연구를 위한 model로서 광범위하게 이용되고 있다^{1, 10)}.

본 실험에 사용된 柴胡(Bupleuri Radix)는 繖形科(Umbelliferae)에 속한 多年生 草本인 柴胡의 뿌리를 건조한 것으로, 性味가 辛苦微寒하고 氣香質輕하여 비교적 양호한 退熱作用이 있으며 化解退熱, 疎肝解鬱, 升舉陽氣의 작용으로 感冒發熱, 寒熱往來, 胸滿脇痛, 口苦耳聾, 頭痛目眩 等を 치료한다³²⁾.

足三里(ST₃₆)⁸⁾는 外膝眼下 3寸의 脛骨支外側 약 1寸處에서 脛骨前 肌肉中에 위치하며 足陽明胃經의 土合穴이다. 疎風化濕, 通調經絡의 효능으로 膝關節痛, 四肢의 浮腫, 脚氣等を 치료한다.

Adjuvant 關節炎의 藥鍼處置 연구로는 草龍膽⁹⁾, 草烏¹⁰⁾, 牛膝¹¹⁾, 續斷¹²⁾ 等を adjuvant 關節炎에 유효하다고 보고하였으나 柴胡를 藥鍼으로 사용하여 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 炎症抑制 및 炎症傳達物質의 生成에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 생쥐의 關節에 Adjuvant로 關節炎을 誘發시키고 和解退熱의 效能이 있는 柴胡(Bupleurum falcatum Linne.)¹³⁾를 材料로 한 藥鍼液(Bupleuri Radix Herbal-acupuncture solution)을 膝關節痛, 四肢浮腫等の 중

상에 효능이 있는 足三里(ST₃₆)⁸⁾에 投與하여 炎症性 cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 변화 및 synovial fluid에서 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 변화를 관찰하였다.

임상적으로는 發赤, 發熱, 腫脹, 痛覺過敏 및 機能障礙의 5가지 증상을 나타낸다. 이러한 각 단계의 발현기전은 서로 다르며 다양한 약리학적 활성물질이 국소적으로 生成 誘導되어 反應을 매개한다. 이와같은 물질을 chemical mediators라 하며 prostaglandins (PGs), histamine, serotonin, leukotriene 등이 여기에 속한다. 또한 炎症領域으로 유주한 多核白血球, 單核食細胞(macrophage), 淋巴球에서 방출하는 다양한 cytokine, 活性酸素(superoxide anion radicals) 및 加水分解 酵素, 鹽基性 蛋白 등이 炎症反應에 직접적으로 관여하게 된다.

본 실험에서는 생쥐에 adjuvant로 關節炎을 誘發시키고 關節液(synovial fluid)에서 PGE₂의 量이 柴胡藥鍼의 投與로 有意性있게 減少하였다. 이는 柴胡藥鍼이 關節의 滑膜細胞에서 磷脂質 代謝와 관련된 酵素들(phospholipase A₂, cyclooxygenase)의 활성을 抑制시킨다고 여겨진다. 따라서 많은 연구자들은 炎症反應을 抑制하기 위해 새로운 물질탐구의 일환으로 천연물 및 해양물 등에서 phospholipase A₂ 및 cyclooxygenase저해제의 탐색에 관한 활성 및 물질분리에 노력을 가하고 있다³⁴⁾.

浮腫이란 細胞間이나 組織間의 體腔에 體液 즉, 炎症性 浮腫液이 과다하게 축적되는 것을 말하는데 이러한 滲出液(exudate)은 炎症에 의해 內皮細胞의 透過性이 항진되어 생기는데 histamine, bradykinine, prostaglandin, anaphylatoxin 등이 관여하는 것으로 알려져 있으며 炎症이 심할수록 增加한다. 결국 炎症이 심해지면 滲出液이 增加되어 浮腫이 심해지게 되므로 浮腫를 측정해보면 炎症의 심한 정도 및 진행과정을 간접적으로 확인할 수 있다고 사료된다²⁾.

본 실험에서는 각 濃度別 柴胡藥鍼의 足三里(ST₃₆)⁸⁾ 投與로 adjuvant 投與 후 實驗群의 제 1일~제 9일 사이에는 對照群에 비하여 별다른 抑制를 나타내지 못했다. 그러나 제 21일에서는 對照群에 비해 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 의 濃度에서는 36.8%, $\times 1$ 의 濃度에서는 52.6%, 그리고 $\times 2$ 의 濃度에서는 54.7%의 抑制效果를 보임으로써 기간별, 濃度依存的 억제효과가 나타났다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)에서는 柴胡藥鍼($\times 1$) 投與群에서도 31.6%의 抑制效果를 나타내었다.

Cytokine은 매우 소량으로 造血作用, 免疫反應, 一般的 炎症過程에 관여된 표적세포의 표면수용체에 결합하여 그 표적세포의 고유기능을 항진시킴으로서 여러 가지 생리.병리학적 소견을 도출하는데³⁵⁾, cytokine의 과도한 합성과 부적절한 抑制에 의하여 병리생리학적 기전이 이루어진다고 알려져 있다³⁶⁾.

IL-1은 주로 大食細胞에서 生成이 되는 cytokine의 하나로 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두가지 형태가 있으며³⁷⁾, fibroblast, synovial cells 및 endothelial cell의 성장을 촉진하며⁴⁷⁾ IL-1 β 는 호중구, 淋巴球 및 單核細胞 등 炎症細胞의 浸潤을 誘發한다³⁸⁾.

본 실험에서는 對照群은 正常群에 비하여 3.2배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 23.5%로 有意性(p<0.05) 있는 억제효과가 보였고, $\times 1$ 에서 42.2%, $\times 2$ 에서 44.1%로 각각 매우 현저한 有意性(p<0.005)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 16.7%의 抑制效果가 나타났다.

IL-6은 많은 연구자³⁹⁾들이 급성 조절단백으로 류마티드 關節炎에서 炎症 反應의 주요매개체로 작용하여 혈청 및 關節炎에 손상된 關節의 關節液에서 IL-6의 活性度가 增加하며 특히 外傷性關節炎 및 骨關節炎보다 높은 活性度를 보여 질환의 活性度와 연관성이 있다고 보고하고 있으며, 따라서 류마티드 關節炎에서 IL-6이 면역反應의 매개체

로서 病態 생리에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되고 그 역할은 특정 IL-1이나 TNF- α 의 효과를 증폭시키는 것으로 추정되고 있다.

본 실험에서는 對照群은 正常群에 비하여 2.9배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 21.0%로 有意性($p < 0.05$) 있는 억제효과가 보였고, $\times 1$ 에서 28.4%, $\times 2$ 에서 39.5%로 각각 현저한 有意性($p < 0.01$)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 16.0%의 抑制效果가 나타났다.

TNF- α 와 IL-1 β 는 류마티드 關節炎에서 T細胞와 B細胞의 機能을 增加시키고, neutrophil, lymphocyte 및 monocyte의 化學流走 및 纖維母細胞 增殖, 滑膜纖維母細胞와 軟骨細胞에 作用해서 prostaglandin E₂(PGE₂)와 collagenase 生産을 增加시킨다⁴⁰⁾.

본 실험에서 對照群은 正常群에 비하여 6.2배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 16.1%로 억제되었으며, $\times 1$ 에서 32.3%, $\times 2$ 에서 51.6%로 각각 매우 현저한 有意性($p < 0.005$) 있는 억제효과를 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)은 12.9%의 抑制效果가 나타나 $\times 0.5$ 의 농도와 비슷한 정도로 억제시키는 것으로 나타났다.

Prostaglandin(PG)은 炎症의 chemical mediators중 藥理 및 生理學的으로 중요한 물질로 細胞膜에 存在하는 磷脂質에서 由來된 不飽和脂肪酸의 代謝産物이며, PG의 生成에는 phospholipase A₂, cyclooxygenase 및 hydroperoxidase가 關여하는 一連의 酸化反應이다³⁴⁾.

이중 PGE₂는 內因性 發熱物質이라고 알려진 interleukin-1 β , interleukin-8 및 tumor necrosis factor- α 에 의해 生成이 誘導되어 bradykinin과 같은 강력한 發炎物質의 作用을 增強시킬 뿐만 아니라 視床下部의 體溫調節中樞에 作用하여 體溫上昇을 誘發한다. 또한 PGE₂는 骨髓細胞에 作用하여

破骨細胞(osteoclast)의 前驅細胞(preosteoclast)를 誘導하는 作用이 있다고 알려져 있다³³⁾.

본 실험에서 對照群은 正常群에 비하여 4.0배의 증가를 보였으며, 實驗群은 對照群에 비하여 柴胡藥鍼 $\times 0.5$ 에서 26.2%로 有意性($p < 0.01$) 있는 억제효과가 보였고, $\times 1$ 에서 44.1%, $\times 2$ 에서 39.3%로 각각 매우 현저한 有意性($p < 0.005$)을 나타냈다. 任意穴刺戟群(BL, blank locus)에서도 26.2%의 抑制效果가 나타났다.

따라서 adjuvant에 의해 誘導되어지는 PGE₂의 生成增加가 柴胡藥鍼의 전처치에 의해 減少한다는 사실과 柴胡藥鍼이 抗炎症作用을 가진다는 사실은 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 生成阻害作用으로 더욱 뒷받침되어진다.

이상의 結果로 보아 柴胡藥鍼은 생쥐에서 adjuvant에 誘發되는 류마티드 關節炎과 關連하여 炎症誘發 中間媒介體의 生成을 抑制시키고 痛症傳達物質인 PGE₂의 生成을 抑制시키는 것이 관찰되어 炎症化 과정의 抑制 및 炎症傳達物質의 生成을 阻害시키는 作用이 있는 것으로 생각되며 앞으로 柴胡藥鍼의 體液性免疫反應에 대한 效果와 作用紀傳에 關한 지속적인 研究가 필요할 것으로 料된다.

V. 結 論

柴胡藥鍼이 생쥐의 adjuvant 誘發 關節炎에 미치는 效能을 관찰하기 위하여 생쥐의 足三趾에 상응하는 부위에 $\times 0.5$, $\times 1$, $\times 2$ 의 농도로 柴胡藥鍼을 처치한 후 浮腫과 炎症性 cytokine에 대하여 조사한바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 柴胡藥鍼은 浮腫에 미치는 영향에서는 제 21일에서 濃度依存的 抑制效果를 나타내었다.
2. 柴胡藥鍼은 IL-1 β 에서 濃度를 有意性있게

抑制시켰다.

3. 柴胡藥鍼은 IL-6에서 濃度を 有意性있게 抑制시켰다.

4. 柴胡藥鍼은 IL-8에서 濃度依存的 抑制 效果를 나타내었다.

5. 柴胡藥鍼은 TNF-의 生成을 濃度依存的으로 顯著하게 抑制하였다.

6. 柴胡藥鍼은 PGE₂ 生成을 有意性있게 抑制시켰다.

VI. 參考 文獻

1. 宋彦錫, 안병철, 朴東錫. 加味疎風活血湯 이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 大韓 鍼灸學會誌. 1990;7(1).
2. 大韓整形外科學會. 整形外科學. 서울:最新 醫學社. 1991:121-137.
3. Yilmaz, M., Kendirli, S.G., Altintas, D., Bingol, G. and Antmen B. cytokine levels in serum of patient with juvenile rheumatoid arthritis. Clin. Rheumatol. 2001;20:30-35.
4. Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. J. Biochem. 1989;105:395-9.
5. Nakahata, N., Kutsuwa, M., Kyo, R., Kubo, M., Hayashi, K. and Ohizumi, T. Effects of Kakkon-to, Mao-to, Tokaku-joki-to and San'o-shashin-to on prostaglandin E₂ release from C6 mice glioma cells. J. Traditional Medicines. 1998;15:116-122.
6. Durie FH, Fava RA, and Noelle RJ, Collagen - induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. Clinical Immunol Immunopathol 1994;73(1):11-18.
7. 최영길. Rheumatoid 關節炎의 原因 및 病態 生理. 서울. 醫學情報誌11, 1986:45-47
8. 全國韓醫科大學校 鍼灸經穴學教室 編著, 鍼灸學(下) 서울:集文堂. 1994:1457.
9. 김갑성, 강성길. 草龍膽水鍼에 의한 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. 1987;10:127-49.
10. 강수일. 穴位別 草烏水鍼刺戟이 생쥐의 adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 慶熙大學 校論文集. 1990;13:203-17.
11. 장통형. 牛膝藥鍼이 mice의 adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 尙志大 韓醫學碩士學位 論文. 1999.
12. 이형열. 續斷藥鍼이 adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 大田大韓醫學碩士學位 論文. 2000.
13. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:영림사. 1994:149-50
14. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海:上海科學技術出版社. 1981:71-132.
15. Kwon, Y.B., Lee, J.D., Lee, H.J., Han, H.J., Mar W.C., Kang, S.K., Beitz, A.J. and Lee, J.H. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptiver-responses. Pain 2001;90:271-280.
16. Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Okuda, H., Higashino, M., Tani, T., Namba, K. and Arichi, S. Studies on Scutellariae Radix. VII. Anti-arthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and fla-

- vonoid components from *Scutellariae Radix*. *Chem. Pharm.Bull.*1984;32:2724-9.
17. 남경수, 배윤수, 남명수, 오은숙, 박순 희, 최인성, 정태화. Anti-IL-1 β 단일클 론항체를 이용해서 발열환자의 뇨중 IL-1 β inhibitor의 확인. *약학회지*1993;37:420-6
 18. Na, K.S., Yang, J.H., Choi, M.J., Choi, I., Kim, C.H. and Moon, J.O. Effective production and clinical application of anti-interleukin-6 monoclonal antibodies. *Korean J. Immunol.*1998;20:289-94.
 19. Sharma, S.A., Tummuru, M.R., Miller, G.G. and Blaser, M.J. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infection and Immunity.*1995;63:1681-7.
 20. Kim, C.D., Kim, H.H. and Hong, K.W. Inhibitory effect of rebamipide on the neutrophil adherence stimulated by conditioned media from *Helicobacter pylori* infected gastric epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 1999;288:133-8.
 21. Pradelles, P., Grassi, J. and Maclouf, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids esterase as label : An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.*1985;57:1170-3.
 - 22.金正坤, 李潤浩, 朴東錫 : 鍼, 灸 및 秦 芻水 鍼이 흰쥐의 adjuvant 關節炎에 미치는 영향, 서울, 大韓鍼灸學會誌,10(1):125-131, 1989.
 23. 馬蒔 編註, 黃帝內經素問註證發微, 서울: 大성문화사, p.85, 268, 320.
 24. 張子和. 儒門事親, 臺北, 旋風出版社, 卷 四, pp.7,1978.
 25. 蘇元方. 蘇氏諸病源候論, 臺北, 昭人出版社, pp.11-12, 1974.
 26. 朱震亨. 丹溪心法附餘, 서울, 大成文化 社, pp.206,1982.
 27. 李東垣. 東垣十種醫書, 서울, 大成文化 社, pp.480-481, 1983.
 28. 張介賓. 景岳全書, 上海, 衛生出版社, 卷 十二, pp.211-212, 1972.
 29. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 고문사, pp.71-93, 1166-1171, 1990.
 30. 서울大學敎 醫科大學. 免疫學, 서울, 서울大學敎出版部, pp.1-25, 123, 125, 132, 134, 229-246, 1987.
 31. 박원. 류마티스 關節炎의 定義와 原因, 醫藥情報 19(3):29-33, 1993.
 32. 全國韓醫科大學 本草學敎授 共編著. 本草 學. 서울. 永林社, pp.149-150.
 33. 문진영. 柴胡藥鍼의 生體防禦 效能 研究, 東國大學校 博士學位 論文. 1997;1-97.
 34. Chang, J., Musser, J. H. and Mcgregor, H. Phospholipase A₂ function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* 1987;36:2429-36.
 35. 이수곤, 이지수, 이찬희. 류마티스關節炎의 治療. 과라다임(paradigm)의 變化. 대한류마티스학회지 3(2):103-109, 1996.
 36. 김동집, 박동준. 류마티스關節炎의 病因, 대한류마티스학회지 1:1-12, 1994.
 37. 해리슨내과편집위원회 편. 해리슨내과학, 서울:정담. 1994:155-165.
 38. Arend W.P., Dayer J.M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33(3):305-15, 1990.
 39. Helle, M., Boe3ije, L., Groot, E., Devos,

- A. and Araden, L. Sensitive ELISA for interleukin-6 detection of IL-6 in biological fluid:synovial fluid and sera, *Journal of Immunological Methods*. 1991; 138:47-56.
40. Dayer, J.M., de Rochemonteix, B., Burres, B., Demczuk, S., Dinarello, C.A. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* 1986;77:645-8.