

## 灸津 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

구성태<sup>1</sup> · 신종근<sup>2</sup> · 최윤영<sup>2</sup> · 송정방<sup>2</sup> · 김재효<sup>2</sup> · 김경식<sup>2</sup> · 손인철<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한국한의학연구원 의료연구부, <sup>2</sup>원광대학교 한의과대학 경혈학교실

### Effect of moxi-tar herbal acupuncture on the carrageenan-induced arthritis in rats

Sung-Tae Koo<sup>1</sup>, Jong-Keun Shin<sup>2</sup>, Yun-Young Choi<sup>2</sup>, Jung-Bang Song<sup>2</sup>,  
Jae-Hyo Kim<sup>2</sup>, Kyoung-Sik Kim<sup>2</sup>, In-Chul Sohn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine ;

<sup>2</sup>Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### Abstract

**Objectives :** The purpose of this study was to examine the analgesic effect of moxi-tar on a rat model of carrageenan-induced arthritis and the relations between moxi-tar-induced analgesia and endogenous NO and iNOS, cyclooxygenase-2 (COX-2), and c-Fos protein expression in the spinal cord.

**Methods :** Carrageenan-induced arthritis rat model was used to test the effect of moxi-tar as a chronic pain model. After the induction of arthritis, rats subsequently showed a reduced stepping force of the affected limb for at least the next 4 days. The reduced stepping force of the limb was presumably due to a painful knee, since oral injection of indomethacin produced temporary improvement of weight bearing. Moxi-tar dissolved in ethyl alcohol was injected several acupoints. After the treatment, behavioral tests measuring stepping force were periodically conducted during the next 12 hours.

**Results :** Moxi-tar produced significant improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis lasting at least 9 hours. The magnitude of this improvement was equivalent to that obtained after an oral injection of 3 mg/kg of indomethacin and this improvement of stepping force was interpreted as an analgesic effect. Moxi-tar produced the improvement of stepping force of the affected hindlimb in a dose-dependent manner. Both NO production and iNOS, COX-2 protein expression increased by arthritis were suppressed by moxi-tar. moxi-tar on combination with electroacupuncture (EA) produced more powerful and longer lasting improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis than either moxi-tar or EA did.

**Conclusion :** The present study suggest that moxi-tar produces a potent analgesic effect on the chronic knee arthritis pain model in the rat and that moxi-tar-induced analgesia modulate endogenous NO through the suppression of iNOS/COX-2 protein expression.

**Key words :** moxi-tar, herbal acupuncture, carrageenan, arthritis

· 교신저자: 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학  
경혈학교실, Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458,  
E-mail: ichsohn@wonkwang.ac.kr

· 투고: 2006/02/24 · 심사: 2006/03/07 · 채택: 2006/03/22

## I. 서 론

艾灸療法은 침구치료방법 중의 하나로 內經<sup>1)</sup> 異方法宜論에 “北方者. 天地之所閉藏之域也. 其地高陵居. 風寒水冽. 其民藥野處而乳食. 藏寒生滿病. 其治宜艾熇. 故艾熇者. 亦從北方來.”에서 찾아볼 수 있다. 艾灸療法の 주재료인 艾葉은 국화과에 속하는 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*. Levet Vant), 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai.)과 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.)의 잎을 건조한 것으로서, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용한다<sup>2)</sup>고 알려져 있다.

艾灸療法의 치료작용에 대하여 온열자극을 배제한 후 艾絨의 燃燒生成物만을 이용한 疣贅治驗의 症例를 보고하여<sup>3)</sup> 애용의 연소생성물의 화학적 자극에 의한 애구요법의 치료효과를 증명하였고 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 과산화지질을 저하하는 작용은 艾灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 증명하였다<sup>4)</sup>. 이외에 세포에서 구진이 NO 생성을 억제하고 iNOS 발현을 억제한다<sup>5,6)</sup>고 보고하여 애구요법의 항염증 효과에 대한 기전을 설명하였다. 아울러 구진약침은 일과성 전뇌 허혈 손상에 있어서 BDNF (brain derived neurotrophic factor)단백의 증가를 유도하고 따라서 일과성 전뇌 허혈 손상을 예방하고 치료하는데 효과적이라고 보고<sup>7)</sup>하였다. 최근 약쑥(*Artemisia asiatica*)의 추출물인 DA-9601이 항산화 작용이 있어 NSAID에 의한 위점막 손상<sup>8)</sup>, cerulein에 의한 췌장염<sup>9)</sup>, trinitrobenzoic acid에 의한 대장염<sup>10)</sup> 등 다양한 소화기 질환에서 효과가 보고되었다.

한의학에서 관절은 “諸筋者 皆屬於節”<sup>11)</sup>이라 하여 筋의 기능적 발현의 취합처이며 屈伸內外

轉 및 回轉등을 담당하는 운동기관으로, 관절의 염증성 질환인 관절염<sup>12)</sup>은 다양한 원인으로 인하여 관절부위의 疼痛, 腫脹, 硬直, 發赤, 發熱, 運動障礙가 나타나는 질환이라 하였다<sup>13)</sup>. 이러한 관절염에 나타나는 염증을 억제하고 통증을 제거하기 위해 여러 가지 처방들을 이용하여 왔고, 임상에서는 체내에 광범위하게 또는 국소적으로 진통효과를 나타내기 위하여, 약물치료를 하면서 전침, 약침, 봉침 등과 같은 다양한 형태의 침치료를 병행하고 있다. 이 연구에서 만성 관절염 모델로서 carrageenan으로 유도한 실험모델을 사용하였다. λ-carrageenan은 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 급, 만성 염증을 일으키는 특성<sup>14)</sup>이 있다.

약침요법은 기존의 침법과 한약을 결합하여 발전시킨 新針療法의 일종으로 한약제재를 경혈의 자극수단으로 사용하는 것을 말한다. 즉 순수 한약재에서 정제, 추출하여 經穴에 극소량의 약물을 주입함으로써 침의 작용과 한약의 작용을 병행하여 치료를 보다 극대화시키기 위한 新針療法을 말한다<sup>15)</sup>. 현재 한의학 임상에서 다양한 종류의 약침이 활용되고 있으며 그 치료의 유효성이나 효과 기전에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

이에 저자는 carrageenan으로 유도한 관절염 실험동물 모델을 사용하여 구진 약침의 진통 효과와 척수에서 hypersensitivity를 유발하는 iNOS, COX-2, c-Fos의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하여 다음과 같은 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구

입한 수컷 Sprague-Dawley (6주령, 170- 190g)가 사용되었다. 동물은 온도  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 10\%$ 의 조건에서 12시간 주야로 주기를 바꿔 주면서 한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

## 2. 구진 취득

구진은 애용의 연소생성물로서 안의 방법<sup>5,6)</sup>을 근거하여 취득하였다. 간단히 기술하면 삼각 플라스크 입구에 링을 올려놓고, 땀속(봉래구관, 서울) 5 g을 원뿔 모양으로 만들어 연소한 후 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 연소생성물을 모은다. 플라스크 바닥에 모인 연소생성물을 methanol 100 %로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 증탕증류기를 이용하여 methanol을 90 % 증발시킨다. 구진과 methanol 혼합물을  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨 후, culture용 DMSO(sigma)를 용매로 100 mg/ml의 농도로 분류하여 실험에 사용하였다.

## 3. 약침 자극

구진을 에틸알코올에 1 mg/ml 또는 20 mg/ml 의 농도 용해시켜 사용하였다. 구진은 인슐린 주사기(0.5 cc, 29 gauge 1/2")를 사용하여 健側, 患側 犢鼻와 患側 下巨虛부위에 200  $\mu\text{l}$  씩 주입하였다.

## 4. 전침자극

직경 0.25 mm, stainless-steel 재질의 한 쌍의 침을 健側 足三里(ST<sub>36</sub>)에 삽입하였다. 동물에

서 자침은 사람의 경혈 자리에 상응하는 부위에 자침하였다. 침은 pulse generator(stimulator)에 연결되어 1 ms duration, 4 pulse의 train(1 ms의 정사각파, 100 Hz의 intra-train frequency)이 출력되었다. 실험하는 동안 사각파의 주파수(frequencies)는 2 Hz를 사용하였으며, 강도(intensity)는 2 mA(muscle twitch threshold의 10배정도의 강도로써, muscle twitch threshold는 보통 200  $\mu\text{A}$  근방이다)의 자극 강도를 사용하였다. 양극(+,-)은 전극의 분극(polarization)을 막기 위해 1분마다 역전되었다. 전침 처치가 끝난 즉시 마취는 중단되었으며 5~10분 내에 동물은 완전히 깨어나 정상적으로 활동하기 시작하였다. 총 자극시간은 30분으로 하였다. 관절염모델에서 weight bearing force는 전기적 자극 후 1시간, 2시간, 4시간에 측정하였다.

## 5. 관절염 유도

관절염은 Enflurane(Ilsung pharmaceuticals, Seoul, Korea)과 O<sub>2</sub>로 혼합된 마취상태에서 생리식염수에 녹인 2 %  $\lambda$ -carrageenan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50  $\mu\text{l}$ 를 오른쪽 무릎의 관절강에 주입하여 유발시켰다. 주입 후 마취를 중단하였으며, 수술 받은 쥐들은 5~10분 내에 마취에서 회복되었다.

## 6. 동물행동 검사

통증 정도를 측정하기 위해서 관절염이 유발된 후의 바닥을 밟는 힘을 측정하였다. 동물을 투명한 아크릴로 만든 긴 통로(폭 10 cm, 높이 10 cm, 길이 60 cm)를 자유롭게 걷게 하고, 통로 바닥의 절반에 전자저울(Acculab, Pocket pro 250-B, Newton, PA, USA)을 설치하여 한 쪽 발이 디디는 압력만을 측정하였다. 전자저

울에서 나오는 전기신호는 압력의 변화를 전압의 변화로 보여주는데 이를 CED(1401 plus)에 연결하여 spike 2 프로그램(Cambridge Electronic Design Ltd, UK version 4.12)으로 전압의 변화를 관찰하였다. 발이 닫는 압력(Weight Bearing Force; WBF)은 총 회복률(Full Recovery Rate; FRR)로 변환하여 측정값으로 사용하였는데 이는 다음과 같은 공식으로 구하였다.

$$FRR(\%) = (\text{灸津 주입 후 증가한 WBF} / \text{관절염으로 감소한 WBF}) \times 100$$

관절염 모델 동물의 WBF가 시간 경과에 따른 변화를 측정하기 위하여 관절염 유발 후 일정한 시간마다 측정하였다. 모든 행동검사는 각 측정 시간마다 3회 실시하여 평균값을 취하여 측정값을 얻었으며 행동검사는 맹검법으로 시행하였다.

## 7. 약물

구진의 진통효과의 강도를 비교하기 위하여 indomethacin을 투여하였는데, indomethacin(Sigma, St. Louis, MO)은 물에 용해시켜 1mg/kg, 3mg/kg의 농도로 구강으로 투여하였다.

## 8. 단백질의 분리 및 정제

척수에서 c-Fos, COX-2, iNOS 단백질 발현을 측정하기 위하여 대조군, Carrageenan 유발성 관절염 실험군 및 관절염에 구진 약침을 준 실험군의 동물들을 chloralhydrate 250 mg/kg으로 마취하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 심장관류하여 혈액을 제거한 후 재빨리 요추부 척수를 박리하였다. 박리된 척수는 dry-ice powder에 신선하게 얼려

사용할 때까지 -80℃에 보관하여 놓았다. 보관된 척수에 homogenization buffer 3 ml를 가하여 homogenizer로 3회(15초 갈고 10초 쉬는 행위를 3회 반복) 균질화시킨 후, 3,000 ×g로 10분 동안 원심분리시켰다. 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80℃에 저장하여 놓았다. 이 시료는 COX-2, iNOS 단백질을 분석하기 위해 사용되었다. 이 시료를 4℃에서 13,000 ×g로 10분 동안 2회 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80℃에 저장하여 놓았다. 이 시료는 c-Fos 단백질을 분석하기 위해서 사용되었다.

## 9. 산화질소 정량

척수조직 내 산화질소(NO) 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 안정된 마

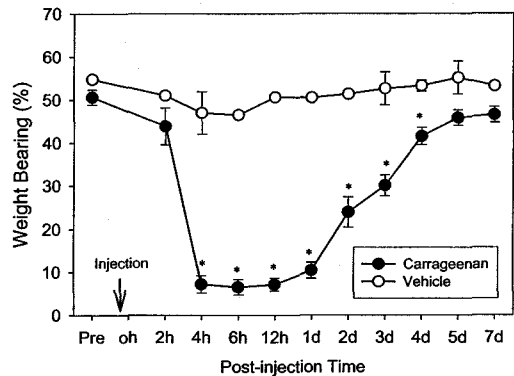


Fig. 1. Time course of carrageenan-induced arthritis model.

Post-injection time is expressed as hours(h) and days(d) after Carrageenan injection. Pre-injection control was taken one day before the injection (Pre). Asterisks indicate values significantly different from the pre-injection control value by one-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test (n=10)

지막 산물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>에 대해서 분석하였다.

간단히 기술하면, 각 샘플 40  $\mu$ l와 MOPS buffer(50mM MOPS/1mM EDTA, pH 7.0) 45  $\mu$ l를 혼합하고 reconstituted Escherichia coli nitrate reductase(500 $\mu$ l MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5  $\mu$ l를 가한 후 2mM NADH 10  $\mu$ l를 가하여 20분 동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 50  $\mu$ l Griess reagent A(1% sulfanilamide in 3N HCl)와 짧게 반응시키고, 50  $\mu$ l Griess reagent B(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2HCl)와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, purple azo dye가 생성되면 30분 이내에 Microtiter plate reader를 이용하여 540nm에서 흡수율을 측정하였다. Nitrite 농도의 표준곡선은 NaNO<sub>3</sub>로부터 계산되었다.

## 10. Western blot 분석

단백질 blotting을 위하여 보관하여 놓은 단백질 시료를 5배 농축된 SDS sample buffer (1×125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol, 0.003% bromophenol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol)와 섞어서 98℃에서 5분간 끓인 후 10,000 rpm에서 5~10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel에 걸쳐서 electrophoresis를 한다. 그리고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer시킨다. Membrane은 실온에서 blocking buffer (TBS-T에 5% skim milk, 10% NaH<sub>3</sub>를 포함)에 blocking을 하고, anti-iNOS, anti-COX-2, anti-c-Fos antibody를 1:1,000으로 하여 1시간 동안 반응시킨 후 4℃에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase-conjugat-

ed secondary antibody(Anti-rabbit IgG)와 2시간 동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 실온에서 NBT/BCIP solution (Sigma, St. Louis, LO, USA)에 5분 동안 반응시켜 발색하였다.

## 11. 통계분석

실험결과는 Mean $\pm$ SEM으로 나타내었다. 통계검사는 Dunnett's post-hoc test에 의한 one way repeated measure analysis of variance (ANOVA)로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

# III. 실험 결과

## 1. 관절염 모델에서 WBF의 변화

관절염 모델에서 받는 압력(Weight Bearing Force; WBF)의 변화를 측정하였다. 관절염을 유발하기 전에 건강한 흰쥐에서 뒷발에 대한 WBF를 측정된 결과 정상 상태에서는 몸무게의 55% ~ 60% 가량의 힘이 가해지는 것을 관찰할 수 있었다. 무릎 관절에 염증을 유발하면 통증으로 인하여 WBF이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 생리식염수와 2% Carrageenan 50  $\mu$ l를 오른쪽 관절강에 주입한 결과 Fig. 1.에서 볼 수 있는 것처럼 생리식염수를 주입한 동물은 WBF의 변화가 거의 없었지만, Carrageenan을 주입한 동물에서는 주입한 후 4시간 후부터 현저하게 WBF가 감소하기 시작하여 6시간 후에 최대로 감소하였다. 이러한 통증 행동은 시간이 지나면서 차츰 회복 되었는데 약 4일 정도 통증이 유지되었다 (Fig. 1.).

Carrageenan으로 유도한 관절염 모델에서 실험동물은 무릎 관절강 내의 염증으로 인한

통증을 느끼기 때문에 염증이 유도 된 쪽 발로 WBF을 줄여서 통증을 덜 느끼기 위한 행동을 하는 것으로 생각하여 본 연구에서는 이러한 행동양상을 이용하여 줄어든 압력을 통증에 대한 척도로 삼았다.

## 2. 관절염 모델에 대한 구진 약침의 진통 효과

Carrageenan의 슬관절강 내 주입에 의해 유발된 관절염 모델에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 구진 약침의 진통 효과를 알아보았다. 모든 동물은 Carrageenan의 주입으로 관절염이 유도된 후 동측 하지의 weight bearing이 현저하게 감소되었다. 실험군은患側 犢鼻에 구진 약침을 20 mg/ml의 농도로 200  $\mu$ l를 주입하였으며, 대조군은 에틸알코올을患側 犢鼻 같은 부위를 주입하였다. 약침 투여 후, 1시간, 2시간, 4시간, 째에 동물 행동 테스트를 실시하였다. 구진 약침군은 주입 후 1시간, 2시간에 약침주사하기 전 값에 비해 weight bearing이 유의하게 개선되었다(Fig. 2). 대조군은 유의한 변화를 나타내지 않았다.

## 3. 관절염 모델에 대한 Indomethacin의 진통 효과

구진의 진통효과의 강도를 비교하기 위하여 관절염 모델에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 indomethacin의 효과를 조사하였다. 실험군은 indomethacin 3 mg/kg을 구강으로 투여하였으며, 대조군은 구강으로 물을 주입하였다. 처치 후, 1시간, 2시간, 4시간째에 동물 행동 검사를 실시하였다.

indomethacin 3mg/kg이 투여된 실험군은 투여 후 1시간(FRR; 33.75 $\pm$ 2.83 %), 2시간(FRR; 28.98 $\pm$ 3.40 %)에 손상 받은 동측하지의 WBF

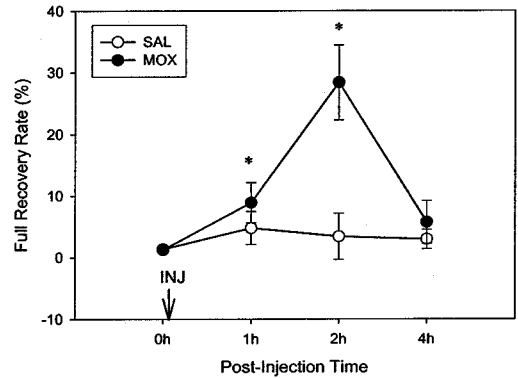


Fig. 2. Effect of moxi-tar injection on foot stepping force in a Carrageenan-induced arthritic rats.

All animals were subjected to the injection of carrageenan into the knee joint on the right side of rats and showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis as evidenced by a dramatic lowering of foot stepping force when compared to the preoperative value. moxi-tar (MOX) (20 mg/ml, 200 $\mu$ l) or normal saline (SAL) was injected to ipsilateral ST<sub>35</sub> point of the rats (n=8). After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 1h, 2h, 4h. moxi-tar showed a significant improvement of stepping force of the limb at 1h and 2h after moxi-tar injection. Asterisks indicate the values that are significantly different from the pre-treatment baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

이 유의하게 개선되었다. 대조군은 실험하는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. indomethacin 투여 후 1시간에 WBF의 변화가 가장 컸으며, 그 후 시간이 지날수록 WBF가 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig.3).

구진 약침의 진통효과와 비교하여 보았을 때, 구진 20 mg/ml, 200 $\mu$ l 주입이 indomethacin 3 mg/kg과 비슷한 진통효과를 나타냄을

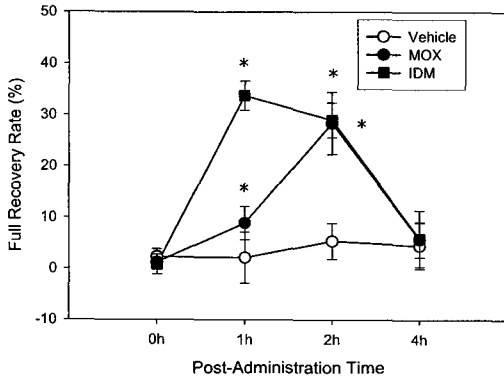


Fig. 3. Effect of Indomethacin on weight bearing force in carrageenan-induced arthritis. Indomethacin 3 mg/kg were orally administered. After the termination of injection, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 1h, 2h, 4h. Control group orally administered only water (n=8). Indomethacin 3mg/kg showed a significant improvement of stepping force of the limb affected by arthritis. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

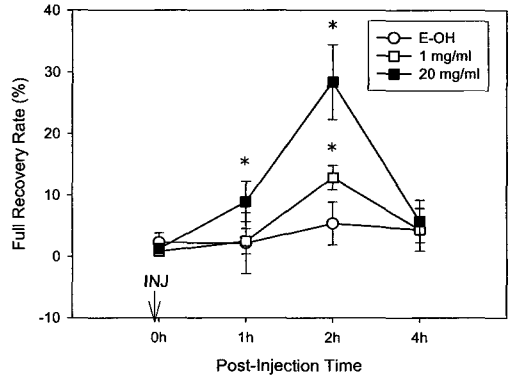


Fig. 4. Dose dependent effect of moxi-tar injection on carrageenan-induced arthritis. Two doses of moxi-tar (1 mg/ml, 20 mg/ml) or ethyl alcohol (E-OH) was injected to rats. After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 0h, 1h, 2h, 4h. In 8 rats with arthritis, ethyl alcohol and two doses of moxi-tar dissolved in ethyl alcohol were applied after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner. Asterisks indicate values significantly ( $p < 0.05$ ) different from the pre-treatment baseline value by one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test.

알 수 있었다.

#### 4. 관절염 모델에 있어서 구진의 농도에 따른 진통효과

구진의 농도에 따른 진통효과를 알아보기 위하여 carrageenan을 관절강 내 주입하여 유도한 관절염 모델에서 농도별 구진 약침 투여가 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 다음날, 실험군은 1 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 구진을 200  $\mu$ l씩 환측 독비에 약침 주사하였고, 대조군은 에틸알코올 200  $\mu$ l를 환측 독비에 주사하였다. 처치 후 1시간, 2시간, 4시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

에틸알코올을 주사한 동물은 감소된 WBF의

유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 구진을 10 mg/ml을 투여한 실험군에서는 약침 주입 후 2시간째에 유의한 증가를 보였다(FRR;12.83 $\pm$ 1.98%). 이에 비해, 구진 20 mg/ml를 투여한 군에서는 1시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR;9.91 $\pm$ 3.25%) 이러한 효과는 2시간(FRR;28.38 $\pm$ 6.06%)까지 지속되었다(Fig. 4).

#### 5. 관절염모델에 있어서 침, 구진 및 침과 구진의 결합치료의 진통효과

전침과 구진 약침을 각각 단독으로 또는 결

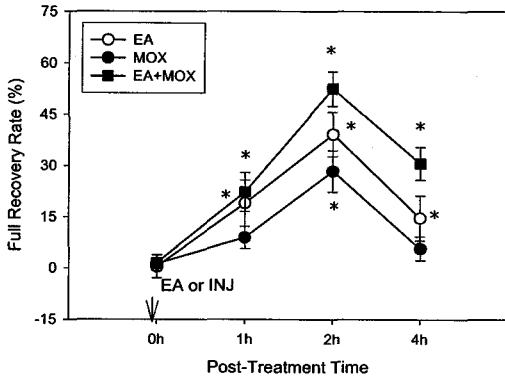


Fig. 5. Effect of EA, moxi-tar, and co-treatment of EA and moxi-tar on carrageenan-induced arthritis.

Eight rats were divided into 3 groups on random order. One group applied EA to the ST36 acupoint of contralateral hindlimb. In the other group, moxi-tar (MOX) (100 mg/ml, 200 $\mu$ l) was injected ipsilateral ST35. In the third group, moxi-tar was injected after EA stimulation. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, and 4h after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

합하여 처치하였을 때 관절염에 의해 감소된 weight bearing에 대해 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 carrageenan으로 관절염을 유발하고 健側 足三里에 전침자극을 하고 患側에 구진 약침을 주어서 효과를 비교하였다. 실험군은 전침군, 구진약침군, 전침과 구진약침 결합군으로 나누어 실험하였다. 전침군은 관절염이 유도된 동물의 건측하지의 足三里에 마취 상태에서 30분간 전침 자극을 하였다. 결합치료군은 전침군과 같이 足三里에 전침을 자극하고 자극이 끝난 5분후에 구진을 환측 犢鼻에 약침을 주사하였다. 구진약침군은 전침자극이 끝나는 시간에 투여하였다.

건측 족삼리 전침자극군은 감소한 weight bearing이 전침 자극 후 1시간에서 4시간까지 유의하게 증가하였으며, 구진 약침군은 weight bearing이 1시간 후부터 증가하기 시작하여 2시간까지 지속되었다. 이에 반해 구진과 전침 결합치료군은 관절염에 의해 감소된 weight bearing을 더욱 강력하게 개선시켰으며, 그 효과는 4시간 후까지 지속되었다(Fig.5).

6. 건측과 환측 비교 건측과 환측 약침 효과를 비교하기 위하여 구진을 健側 犢鼻와 患側 犢鼻에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 다음날, 20 mg/ml 농도의 구진을 200  $\mu$ l 씩 患側과 健側 犢鼻에 약침 주사하였고, 처치 후 1시간, 2시간, 4시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

건측 독비에 약침 주사한 동물은 약침주입 후 유의한 weight bearing의 변화가 나타나지 않았다. 이에 비해, 환측 독비에 약침 주사한 동물은 1시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며 weight bearing의 증가는 2시간 후에 최대(FRR; 28.38 $\pm$ 6.06%)가 되었다(Fig.6).

### 7. 환부 주위혈과 원위부혈의 효과 비교

환부 주위혈 약침의 효과와 원위부 혈위의 약침 효과를 비교하기 위하여 구진을 患側 犢鼻와 下巨虛에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 다음날, 100 mg/ml 농도의 구진을 200  $\mu$ l 씩 患側 犢鼻와 下巨虛에 약침 주사하였고, 처치 후 3시간, 6시간, 9시간, 12시간째에 동물 행동검사를 실시하였다.

患側 下巨虛에 약침 주사한 동물은 검사를 실시한 전 시간에 걸쳐서 유의한 weight



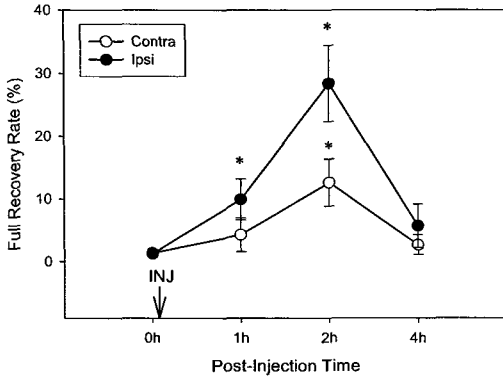


Fig. 6. Effect of moxi-tar injected into unilateral ST35 on carrageenan-induced arthritis. Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, moxi-tar (MOX) (20 mg/ml, 200 $\mu$ l) was injected to contralateral ST35 acupoint of knee joint. In the other group, same concentration and volume of Moxi-tar was injected ipsilateral ST35. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, 4h after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

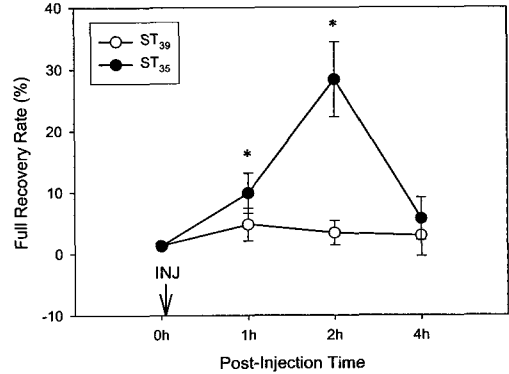


Fig. 7. Effect of moxi-tar injected into ST<sub>35</sub> or ST<sub>39</sub> on carrageenan-induced arthritis. Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, moxi-tar (MOX) (20 mg/ml, 200 $\mu$ l) was injected to ipsilateral ST<sub>39</sub> acupoint of hind limb. In the other group, same concentration and volume of moxi-tar solution was injected ipsilateral ST<sub>35</sub>. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, 4h after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

bearing 증가를 관찰할 수 없었다. 이에 비해, 환측 독비에 약침 주사한 동물은 6시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR; 35.61 $\pm$ 4.27%) 이러한 효과는 9시간(FRR; 21.61 $\pm$ 4.57%)까지 지속되었다(Fig.7).

## 8. 관절염 동물의 척수에서 NO 분석

슬관절강내 2% carrageenan 50 $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 20 mg/ml 농도의 구진을 환측 독비에 200 $\mu$ l를 약침 자극을 주어 구진 약침이 척수에서 NO에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 구진 약침 주입을 하고 2시간 후에 척수 조직을 적출하여 NO를 분석하였다. Fig. 8에 보이는 것처럼 정

상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 구진을 처치한 동물들의 척수에서 NO를 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물(13.49 $\pm$ 0.36 nmol/mg)에 비해 NO의 생산이 유의하게 증가하였으며(22.62 $\pm$ 1.62 nmol/mg), 구진약침을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 NO가 감소하였다(17.75 $\pm$ 1.23 nmol/mg) (Fig. 8).

## 9. 관절염 동물의 척수에서 iNOS 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 2% carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 20 mg/ml 농도의 구진을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주

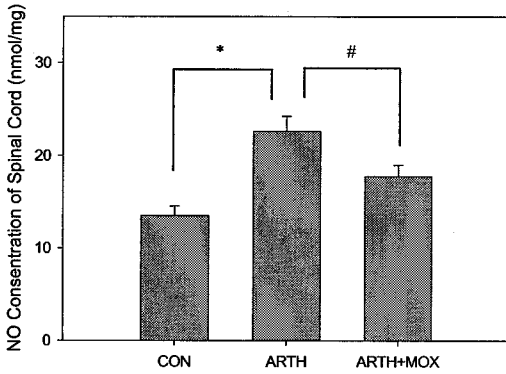


Fig. 8. Effect of moxi-tar on the nitrite/nitrate levels of spinal cord in the carrageenan-induced arthritis. NO production on the spinal cord was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. Arthritis group was not performed any other treatment except for ethyl alcohol administration. Data are expressed as mean±SEM. \*  $p < 0.05$ , compared with the untreated control group. #  $p < 0.05$ , compared with the arthritis group.

어 구진 약침이 척수에서 iNOS 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 구진 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 iNOS를 분석하였다. 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 구진 약침을 처치한 동물들의 척수에서 iNOS를 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 iNOS의 발현이 유의하게 증가하였으며(163.97±4.90 %), 구진을 처치한 관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 iNOS의 발현이 감소하였다(136.38±14.94 %). (Fig.9)

#### 10. 관절염 동물의 척수에서 COX-2 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 100 mg/ml 농도의

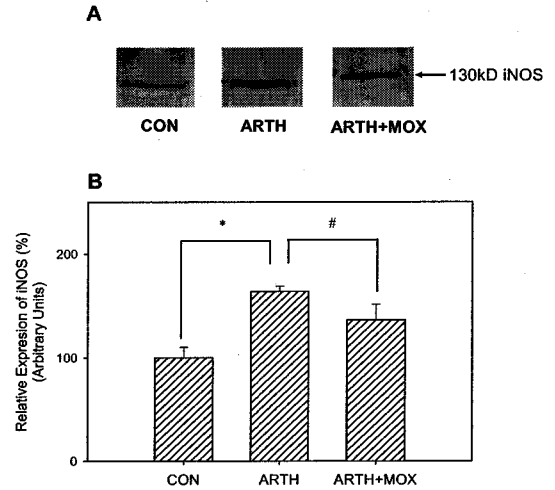


Fig. 9. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of iNOS expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The iNOS signal was enhanced in the sample from the carrageenan-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from moxi-tar treated arthritis group (ARTH+MOX) when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean±SEM. \*  $p < 0.05$ , compared with the untreated control group. #  $p < 0.05$  compared with the arthritis group.

구진을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 구진 약침이 척수에서 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 구진 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 COX-2 발현을 분석하였다. 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 구진 약침을 처치한 동물들의 척수에서 COX-2 발현을 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 COX-2의 발현이 유의하게 증가하였으며(149.2±7.3 %), 구진을

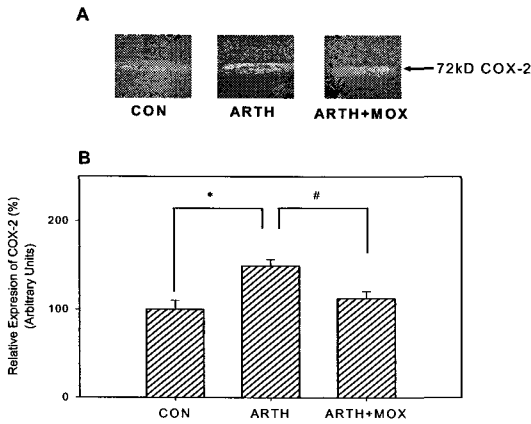


Fig. 10. Effect of moxi-tar on the COX-2 expression in the spinal cord.

Western blot (A) and densitometric (B) analysis of COX-2 expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The COX-2 signal was enhanced in the sample from the carrageenan-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from moxi-tar treated arthritis group (ARTH+MOX) when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$ , compared with the untreated control group. #  $p < 0.05$  compared with the arthritis group.

처치한 관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 COX-2의 발현이 감소하였다(112.4 $\pm$ 7.6 %). (Fig.10)

### 11. 관절염 동물의 척수에서 c-Fos 단백질에 대한 Western blot 분석

무릎 관절강 내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 20 mg/ml 농도의 구진을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 구진 약침이 척수에서 c-Fos 발현에

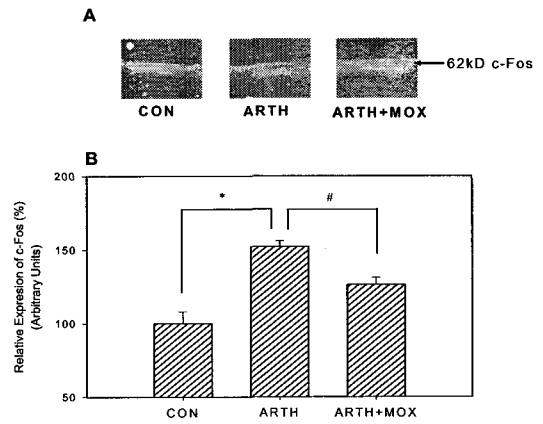


Fig. 11. Effect of moxi-tar on the c-Fos expression in the spinal cord.

Representative Western blot (A) and densitometric analysis (B) of c-Fos in the spinal cord in rats with control (CON), carrageenan-induced arthritis (ARTH), and moxi-tar treatment with arthritis (ARTH+MOX). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Each data represents mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

\*  $p < 0.05$ , compared with control.

#  $p < 0.05$  compared with the arthritis group.

미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 구진 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 c-Fos 발현을 분석하였다. 정상 동물과 관절염 동물 및 관절염 유도 후 구진을 처치한 동물들의 척수에서 c-Fos 발현을 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 c-Fos의 발현이 유의하게 증가하였으며(152.2 $\pm$ 3.8 %), 구진을 처치한 관절염 동물에서는 관절염 동물에 비해 유의하게 c-Fos의 발현이 감소하였다(126.3 $\pm$ 4.7 %). (Fig.11)

## IV. 고찰

灸灸療法의 주재료인 艾葉은 국화과에 속하는 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*).

Levet Vant), 약쑉 (*Artemisia asiatica Nakai.*) 과 野艾 (*Artemisia vulgaris L.*)의 잎을 건조한 것으로서, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되었다<sup>2)</sup>고 알려져 있다.

최근에 보고된 艾灸療法의 치료작용에 대한 연구결과에 있어서, 우선 온열자극에 대한 연구로 林<sup>16-17)</sup>은 문헌적 고찰을 통하여 애용의 연소과정 중에 발생하는 溫熱刺戟이 경혈부위의 국소조직에 가해짐으로써 열분해물질을 생성되어 치료효과를 나타낸다 하였고, 大西基代 등은 돌연변이 억제현상, 혈당조절 및 항균작용, 항위궤양효과, 혈소판 응집 억제작용 등을 보고<sup>18)</sup>하였으며, 이러한 구진의 유효성분으로는 tricosanol, thujone, arachinalkol, hentriacontane, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tanine 및 그 이성체, catechol, 포화지방족 탄화수소 등이 확인되었다<sup>19)</sup>.

관절염은 임상에서 흔히 접하는 질환중의 하나로 심한 통증과 장애를 초래한다. 그 병태생리를 규명하고, 효과적인 치료방법을 알아내기 위하여 많은 연구가 되어왔으나 아직까지 원인이 분명하게 밝혀지지 않았다. 미국에서는 전체 성인의 약 1/3 정도가 부종, 통증, 제한된 관절운동범위 등의 관절염 증상이나 징후를 보이면, 관절염이 50세 이상 성인의 주된 건강문제라고 보고되었다<sup>20)</sup>. 관절염은 지속적인 통증을 동반하여, 일상생활 수행에 불편함을 초래하고, 사고에 대한 가능성을 증가시킨다<sup>21)</sup>. 또한 관절염 환자들이 경험하는 가장 고통스러운 증상인 통증은 관절염 환자의 일상생활 및 삶의 질에 영향을 미치는 가장 중요한 증상으로 보고되고 있다<sup>22)</sup>. 관절염은 현재까지 그 원인이나 치료법이 명확히 확인된 바가 없기 때문에

관절염 유발 시 혈중에서 증가하게 되는 각종 단백질 분해 효소나 공격적인 성격을 갖는 싸이토카인 등의 조절제 혹은 관절염에 의해 생기는 통증을 억제하는 진통제 등이 그 치료제로 이용되고 있는 실정이지만<sup>23,24)</sup>, 골수억제, 고혈압, 간장 및 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용을 유발하여 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

한의학에서 관절염은 주로 痺證의 범주에 속한다<sup>25,26)</sup>. 痺證은 <黃帝內經>에 최초로 나타나는데, <素問 痺痛編>에 “風寒濕 三氣가 혼합되어 痺證이 되는데, 風氣가 勝할 때는 行痺가 되고, 寒氣가 勝할 때는 痛痺가 되고, 濕氣가 勝할 때는 着痺가 된다.”, “소위 痺라는 것은 風寒濕邪에 重感되어 발생한다.”, “飲食居處가 病의 근본이 된다.” 라고 하였다. 後代에는 痺證이 濕生熱, 혹은 風寒鬱熱로 인하여 身上如鼠走, 脣口反縱, 肌肉變色하게 된다 하였다. 痺證의 치료원칙으로서 宣通이 共通治法이 되고, 風寒濕熱의 邪氣에 대하여 각각 祛風, 散寒, 除濕, 清熱藥物을 적절히 배합하여 다스리는데, 痺證이 오래되어 瘀血과 痰濁이 생겨난 경우에는 活血藥物, 祛瘀藥物 및 搜風祛邪藥物을 함께 사용한다. 평소 체질이 허약하거나 혹은 久病으로 허약해진 경우에는 調補氣血, 補腎壯陽, 滋陰養肝하는 약물들을 응용한다<sup>27)</sup>.

해조류의 일종인 *Chondrus crispus*에서 추출한 고분자 물질인 carrageenan이 염증반응을 일으킨다는 사실이 Robertson 등에 의해 보고된 이래 급성 및 만성염증을 일으키는 실험적 모델로 carrageenan이 널리 이용되고 있다. carrageenan은 소량 단회주입만으로도 전신적인 부작용 없이 주입된 관절에서만 염증성 관절염을 일으킨다고 알려져 있다. carrageenan이 대식세포에 선택적인 독성작용이 있음은 이

미 알려진 사실이며, 이는 대식세포의 분해소 체막을 파열시켜 분해효소를 유리시키기 때문에 지속적인 염증반응이 나타나게 된다고 하며, 이때의 염증반응은 인간의 염증성 관절염에서 관찰되는 양상과 비슷하다고 한다.

현 연구는 Carrageenan의 관절강내 주입에 의해 발생된 만성관절염 동물모델에서 구진의 진통작용과 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos가 어떤 관계가 있는지 밝히고자 하였다.

iNOS는 칼슘 비의존성으로 원래 사이토카인에 의해 자극된 대식세포에서 발견되며, 다른 두 형태의 NOS보다 염증과 더욱 밀접한 관계에 있다. 독성을 나타낼 수 있는 양의 NO를 생산할 수 있는 NOS가 바로 iNOS이다. Adjuvant 유도성 관절염 동물에서 iNOS에 대한 immunoreactivity가 synovial tissue에서 나타난다고 한다<sup>28)</sup>. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine과 N-iminoethyl-L-lysine은 adjuvant 관절염과 관련된 혈장 및 관절액에서 nitrite를 농도의존적으로 억제시킬 수 있었다. iNOS는 또한 central sensitization과 관련있다고 증명되었다. iNOS 선택적 억제제는 발바닥 내 Zymosan을 주입하여 발생한 thermal hyperalgesia를 농도의존적으로 억제할 수 있다<sup>29)</sup>. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine은 thermal hyperalgesia를 차단시킬 수 있다<sup>30)</sup>. 척수에서 iNOS는 정상동물 및 adjuvant 관절염 동물에서 ependymal cell layer와 central canal 주위에 있는 ependymal cell의 process에 분포하고 있다고 보고되었다<sup>31)</sup>. Ependymal cell은 CNS에 있는 glial cell의 일종으로, 면역 및 염증반응에 관여한다. Hyperalgesia를 발생시키는 많은 말초자극들은 사이토카인과 같은 가용성 신호전달물질을 방출하여 척수나 뇌에 종결

하고 있는 말초신경을 활성화시킨다. 말초 자극은 척수에서 glial cell들을 활성화시킬 수 있다<sup>32)</sup>. 척수의 glial cell은 사이토카인, NMDA 효연제, NO를 방출시킬 수 있다<sup>31)</sup>. iNOS의 발현은 주로 전사단계에서 조절된다. 그러므로 말초염증이 있으면 이러한 인자들은 말초 뿐만 아니라 CNS에 있는 iNOS의 발현에 영향을 미칠 수 있다. Central canal을 둘러싸고 있는 부위는 serotonin<sup>33)</sup>, SP<sup>34,35)</sup>, glutamic acid decarboxylase<sup>36)</sup>, vasoactive intestinal polypeptide<sup>37)</sup>, calcitonin gene-related peptide<sup>38)</sup>와 같은 여러 신경화학물질들을 유의성있는 농도로 함유하고 있는 곳이다. Ependymal cell들은 central canal 근처에서 방출되는 물질에 의해 활성화된 후 iNOS를 상향조절한다.

본 연구는 만성 슬관절염을 유도한 후 구진을 매일 준 실험군, 구진과 전침 결합치료를 매일 한 실험군, 마취만 처치한 대조군에서 척수의 iNOS 발현양을 분석하였다. 그 결과 정상동물들에 비해 마취만 처치한 관절염 동물의 척수에서의 iNOS가 유의하게 증가되었으며, 구진 단독 혹은 구진과 전침 결합치료를 실시한 실험군은 관절염으로 인해 척수에서 증가된 iNOS를 유의하게 억제시켰다. 또한 구진과 전침을 함께 처치한 실험군이 구진만 처치한 실험군에 비해 iNOS가 유의하게 억제되었다. 만성관절염에서 척수의 iNOS 증가는 염증에 의해 central sensitization 및 hyperalgesia가 발생하였다는 것을 의미하며, 구진이나 구진, 전침의 결합치료를 시행한 후 염증에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현이 감소되었다는 것은 만성관절염 모델에서 전침자극이 위의 두 과정을 억제함으로써 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

NO는 Carrageenan 유도성 슬관절염 모델에

서 말초 염증에 의해 발생된 central sensitization 및 hyperalgesia와 밀접하게 관련되어 있다고 전술하였다. iNOS와 nNOS는 각각 다른 기전을 통하여 NO 합성에 기여하고 있다. iNOS와 nNOS를 차단하면 Carrageenan 슬관 절염에서의 통증을 막거나 제거할 수 있을 것이며, 이는 임상에서의 류마티스 관절염에도 적용되는 것이다. 관절염으로 증가된 iNOS 및 nNOS를 억제시키는 구진 및 전침의 효과는 이러한 치료들이 만성슬관절염을 치료하는 유용한 치료법이 될 수 있음을 시사하는 것이며, 특히 한의학에서 류마티스 관절염을 치료하는데 있어 침치료를 하면서 약물치료를 병행하는 것이 더욱 우수한 치료효과를 나타낼 수 있다는 것을 간접적으로 증명하고 있다. 또한 이러한 결과들은 류마티스 관절염으로 고생하는 환자들에게 하나의 치료방법으로 이용할 수 있음을 실험적으로 입증하는 것이다.

COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 역할을 하는 효소이다<sup>39)</sup>. COX에는 COX-1과 COX-2로 2가지 효소가 있는데, 이들은 서로 아미노산의 60% 정도가 동일하며, 비슷한 효소작용을 가지고 있다<sup>40)</sup>. COX-1은 house keeping gene으로 COX-1에 의해 생성된 prostanoid는 위점막의 세포 보호, 신장의 혈관 확장 및 thromboxane의 합성에 관여한다<sup>39)</sup>. 반면 COX-2는 immediate early gene으로 염증반응, 배란 과정 및 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 대부분의 조직에 본질적으로 존재하는 효소임에 비해, COX-2는 정상상태에서는 의미있게 증가하지 않으나, 염증 cytokin, mitogen, 성장인자 또는 phorbol ester 같은 종양 유도 물질에 의해 증가한다<sup>41)</sup>.

정상적인 생리상태에서 COX 단백질의 발현

은 COX-1이 필요한 방어 기전을 수행하고 있지만 비정상적인 상황과 같은 상처, 병의 발현, 임신과 같은 상황에서는 COX-2 단백질이 유도되어서 COX-1과는 달리 COX-2의 발현은 제한된 상황에서만 일어나는 현상으로서 대장의 상피조직을 관찰한 결과 비정상적인 세포 조직은 주위의 정상적인 조직과 현격한 대조를 이루고 있어서 대장의 상피 조직에서의 암으로 변환하는 조직을 진단하는데 그 표시로서 사용될 수 있다고 하는데 면역조직화학의 비정상적 발달과 다른 중요 기관의 비정상을 초래하는 중요한 원인이 되어서 이들 두 종류의 COX 단백질의 작용 특이성을 잘 보여주었다. COX 단백질 염색을 통한 대장암 조직 관찰 결과에서도 COX-1의 발현은 거의 발견되지 않은 수준이지만 COX-2의 발현은 2배에서 50배까지의 높은 염색된 세포를 발견할 수 있었다<sup>42)</sup>.

염증반응에 의하여 COX-2가 변화하는 동안에도 척수에서의 COX-1의 발현양은 전혀 변화가 없었다. 또한 COX-2 억제제를 이용한 관절염의 연구를 보게되면 반드시 일치된 견해는 보이지 않고 있다. 한 연구에서는 COX-2 억제제에 의하여 혈장의 삼출액, PGE2의 생성, granuloma 및 혈관 신생작용이 억제됨으로서 류마티스 관절염에 효과적이었다고 보고하고 있으나 COX-2 억제제가 monoarthritic rat에서 효과가 없었다는 연구보고도 있다<sup>43)</sup>.

여러 자극에 의하여 활성화된 c-Fos 유전자는 전사와 번역과정을 거쳐 c-Fos 단백질이 합성된다. c-Fos 단백질은 다른 형태의 oncogene인 jun 유전자에서 발현된 Jun 단백질과 결합하여 이중결합체를 형성하며 이것은 다시 핵으로 이동하여 DNA의 activator protein one site (AP-1)에 결합한다. 이러한 결합은 세포에서 다른 유전자의 전사를 조절하여 다양한 세포기

능을 조절함으로써 c-Fos 단백질은 일명 전사 인자(transcription factor) 또는 제 3의 번역인자로 불리운다<sup>44)</sup>. 중추신경계 뉴론들에서 c-Fos 단백질은 다양한 흥분성 반응에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있는데 간질유발약물, 고농도 칼륨, 흥분성 후시냅스성 전위, 전기자극, 통증 유발 등에 의하여 대뇌 피질, 해마, 척수의 후근뉴론 등에서 c-Fos 단백질이 발현된다<sup>45)</sup>. c-Fos 단백질의 발현은 흥분적 자극 후 20분 이내에 시작되어 24시간 이상 지속됨으로써 myc, jun, kroc 등과 함께 일명 immediate-early gene protein이라 하고 세포내 대사활동성의 변화를 측정하는 표식자로 널리 이용되고 있다<sup>44)</sup>. 특히 Hunt 등<sup>46)</sup> 처음으로 마취된 흰쥐의 말초부위에 유해성 자극을 가하여 척수에 존재하는 신경 세포에서 c-Fos 단백질을 관찰하였고, 그 뒤 다양한 유해성 자극에 대한 통증 정도를 확인하는데 활용되었으며<sup>47)</sup>, 흰쥐에서 하지의 피하에 formalin 주입시 척수 및 후근 신경절에서 시간경과에 따른 c-Fos 단백질의 발현 양상 및 척수 부위별 분포 양상이 관찰되었다<sup>48)</sup>. c-Fos 단백질이 formalin 주입 후 척수 수준에서 발현하며, 이것이 통증 반응을 반영하는 것으로 알려져 있으나, 그에 대한 역할에 대하여 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 통각에 대한 척수내 신호처리과정에 관여한다고 추정되고 있으며, Fos mRNA antisense oligonucleotide를 척수강 주입한 후 흰쥐 척수 후근 신경 세포들에서 formalin에 의한 preprodynorphin mRNA의 전사를 억제하고 제 2차 통증반응을 억제한다고 보고되고 있다<sup>49)</sup>. 따라서 Jun계 단백질과 함께 c-Fos 단백질이 다양한 통각자극에 의해 발현되며 preprodynorphin, preproenkephalin과 같은 유전자의 전사를 조절함으로써 장시간 동안 척수내

통증신호전달체계의 기능 변화를 초래한다고 한다.

이 연구는 만성통증 모델로서 carrageenan으로 유도한 관절염 모델을 사용하여 구진 약침의 진통효과와 항염증효과를 알아보았고, 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 구진 약침은 carrageenan으로 유도한 관절염 모델에서 환측 약침 자극은 농도 의존적으로 진통효과를 발휘하였으며, 건측, 원위혈위 자극보다 환측 근위혈위 자극이 보다 유의한 효과를 나타내었다. 구진약침의 진통효과는 전침과 병용했을 때 더욱 효과적이었다. 아울러 구진약침은 말초 염증으로 인해 척수에서 증가한 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos 단백질의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과를 종합하면 구진 약침은 carrageenan으로 유도한 관절염 통증에 진통효과가 있으며, 염증 유발 인자를 억제하는 기전에 부분적으로 NO와 COX 경로가 관여하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 관절염 동물모델에서 구진 약침이 관절염에 의해 감소된 뒷발로 WBF에 미치는 효과와 척수에서 통증지표 중 하나인 NO 생성 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현양상에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Carrageenan으로 유도한 관절염으로 감소된 뒷발의 힘에 대해 구진은 유의한 개선을 보여주었으며, 이러한 진통효과는 적어도 2시간정도 유지되었고 농도 의존적이었다.
2. 구진 20 mg/ml, 200  $\mu$ l 약침은 indomethacin 3 mg/kg의 진통효과에 해당하는

강도의 진통효과를 거두었다.

3. 구진 약침은 건측 자극에 비하여 환측 자극이 더욱 강력한 진통효과를 나타내었고, 원위 취혈보다 근위 취혈이 더욱 효과가 좋았다.
4. Carrageenan으로 유도한 관절염에 구진 약침과 함께 건측 족삼리 전침 자극은 강력하고 더 지속적인 진통효과를 거두었다.
5. Carrageenan으로 유도한 관절염에서 구진 약침은 척수에서 증가된 NO 생성 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현을 유의하게 억제하였다.

본 연구의 결과는 만성 관절염 모델에 있어서 구진이 진통효과를 나타내며, 항염증 효과가 있음을 시사하고 있다. 본 연구의 결과를 토대로 구진의 성분학적 분석에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며 또한 구진이 온열자극과의 융합되었을 경우의 치료효과 등의 연구가 진행된다면 애구요법의 치료효과를 보다 객관화 할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. 張馬合註 黃帝內經 素問 靈樞. 裕昌德書店. 1960 : 100.
2. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 본초학, 서울 : 영림사. 1995 : 405-6.
3. 西谷郁子. 灸およびモグサし燃焼生成物による疣贅治験2症例報告. 全日本灸學會雜誌. 1987 : (3).
4. 西谷郁子, 植田伸夫. 艾の燃焼生成物に含まれる抗酸化作用物質について. 全日本灸學會雜誌. 1988 : 38(1).
5. 안성훈, 구성태, 도진우, 김종성, 김광수, 양범식, 김경식, 손인철. 구진(Moxi tar)이 면역세포에서 iNOS합성에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(1) : 33-46.
6. 안영남, 안성훈, 양기중, 김풍식, 김광수, 김종성, 도진우, 김경식, 손인철. 구진(Moxi tar)이 뇌신경세포에서 Nitric Oxide 생성에 관하여 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(2) : 25-44.
7. 김재효, 이관형, 안영남, 김용득, 김경식, 손인철. 애엽 및 구진 약침이 일과성 전뇌 허혈 손상에 미치는 효과. 대한경락경혈학회지. 2003 : 20(3) ; 61-80.
8. Oh TY, Ryu BK, Ko JI. Protective effect of DA-9601, an extract of Artemisia herba, against naproxen-induced gastric damage in arthritic rats. Arch Pharm Res. 1997 ; 20 : 414-9.
9. Hahm KB, Kim JH, Yoo BM. Induction of apoptosis with an extract of Artemisia asiatica attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. Pancreas. 1998 ; 17 : 153-7.
10. Ahn BO, Ryu BK, Ko JI. Beneficial effect of DA-9601, an Extract of Artemisia herba, on animal models of inflammatory bowel disease. J Appl Pharm. 1997 ; 5 : 165-73.
11. 閔炳奭. 류마티양관절염의 감별진단. 대한의학회지. 1977 ; 20 : 6.
12. 崔容泰外. 最新鍼灸學. 서울 : 成輔社. 1983.
13. 이삼열외. 임상병리검사법. 서울 : 연세대학교 출판부. 1985 : 439-40.
14. Lee DH, Kang SS, Chang IM, Mar WC. Detection of anti-inflammatory agents from natural products as inhibitors of cyclooxygenase I and II. Natural Product Sci. 1997 ; 3 : 19-28.
15. 전국한의과대학 경혈학교실. 침구학(하). 서



- 을 : 집문당. 1988 : 1457.
16. 林鍾國. 灸治療의 文獻的 觀察. 동양의학. 1976 ; 2(1).
  17. 林鍾國. 艾灸의 生體反應에 관한 文獻的 考察. 동양의학. 1976 ; 2(3).
  18. 大西基代 戶田靜男, 菅田良仁, 東家一雄, 黑巖共一, 木村通郎. 艾葉의 燃燒 生成物이 過酸化脂質에 미치는 作用. 全日本鍼灸學會誌. 1990 ; 40(2) ; 228-31.
  19. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울 : 한국메디칼인덱스사. 1989 ; 242-3.
  20. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B, Furst D, Goldsmith C, Kieszak S, Lightfoot R, et al. The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 1993 ; 36(6) : 729-40.
  21. Bradley EM, Papageorgiou AC. Visual analogue scales as a measures of pain in arthritis: A study of overall pain and pain in individual joints at rest and on movement. *Journal of Rheumatology.* 1989 ; 16(1) : 102-5.
  22. Burckhardt CS. The impact of arthritis on quality of life. *Nursing Res.* 1985 ; 34(1) : 1-9.
  23. American College of Rheumatology ADHOC Committee, Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis, *Am. College. Rheumatol.* 1996 ; 39(5) : 713-22.
  24. Michael J, Elliott., Ranvinder N. Maini. New Directions for biological therapy in rheumatoid arthritis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104, 1994 : 112-25.
  25. 정석희. 痺病의 문헌적 연구. *大韓韓醫學會誌.* 1995 ; (16)1 : 10.
  26. 나창수, 안병철. 류마티스성 관절염에 관한 임상적 고찰. *大韓韓醫學會誌.* 1993 ; (14)2 : 364-9.
  27. 姜仁守. 痺證治療의 用藥에 관한 小考. *大韓韓醫學會誌.* 1990 ; (11)1 : 245-52.
  28. Cannor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 1995 ; 273 : 15-24.
  29. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain.* 1991 ; 44 : 179-85.
  30. Meller ST, Dykstra C, Grzynbycki D, Murphy S, Gebhart GF : The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacol.* 1994 ; 33 : 1471-8.
  31. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res.* 1998 ; 118 : 457-65.
  32. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) on lumbar spinal cord

- increases following sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 1991 ; 565 : 1-7.
33. Lamotte CC, Johns DR, Lanerolle NC de. Immunohistochemical evidences of indolamine neurons in monkey spinal cord. *J Comp Neurol.* 1982 ; 206 : 359-70.
34. Tessler A, Glazer E, Artymyshyn R, Murray M and Goldberg ME. Recovery of substance P in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral differentiation. *Brain Res.* 1980 ; 191 : 459-70.
35. Oldfield BJ, Sheppard A, Nilaver G. A study of the substance P innervation of the intermediate zone of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol.* 1985 ; 236 : 127-40.
36. Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.* 1982 ; 238 : 305-28.
37. LaMotte CC. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *J Comp Neurol.* 1987 ; 258 : 527-41.
38. Chung K, Lee WT, Carlton SM. The effect of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett.* 1988 ; 90 : 27-32.
39. Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase : regulation and enzyme expression. *Biochim Biophys Acta.* 1991 ; 1083 : 121-34.
40. Loll PJ, Gravito RM. The isoforms of cyclooxygenase : structure and function. *Expert Opin Invest Drugs.* 1994 ; 3 : 1171-80.
41. Vane J. Towards a better aspirin. *Nature.* 1994 ; 367 : 215-6.
42. Dong YL, Gangula PRR, Fang L, Yallampalli C. Differential expression of cyclooxygenase -1 & -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. *Prostaglandins.* 1996 ; 52 : 13-34.
43. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitor in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology.* 2001 ; 40(7) : 937-46.
44. Morgan JI, and Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system : involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Neurosci.* 1991 ; 14 : 421-51.
45. Birder LA, Roppolo JR, Iadarole mj, and De Groat WC. Electrical stimulation of vesical afferent pathways in the pelvic nerve increase cFos in the rat lumbosacral spinal cord. *Neurosci Lett.* 1991 ; 129 : 193-6.
46. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of cFos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987 ; 328 : 632-4.
47. Abbadie C, Besson JM. cFos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neurosci.* 1992 ; 48 : 985-93.
48. Gagas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory controls : correlation

灸津 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

- of nociceptive behaviour and cFos expression. *Neurosci.* 1991 ; 42 : 617-28.
49. Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, and Hughes J. cFos antisense oligodeoxynucleotide increase formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neurosci.* 1995 ; 65 : 485-92.