

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

김윤희¹ · 임윤경² · 이 현¹

대전대학교 한의과대학 ¹침구학교실, ²경혈학교실

The Effects of Herbal-acupuncture with *Aconiti lateralis Preparata Radix* solution on Collagen-induced arthritis

Yoon-Hee Kim¹, Yun-Kyoung Yim², Hyun Lee¹

¹Dept. of Acupuncture & Moxibustion, ²Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objectives & Methods : The purpose of this study is to observe the effects of *Aconiti lateralis preparata radix* Cortex herbal-acupuncture solution(AIPR-HAS) at ST36 on Collagen II induced arthritis(CIA) in DBA/1J mice. The author performed several experimental items to analyze several cytokines and immune cells related with RA.

Results : 1. In the AIPR-HA group, the incidence of arthritis and arthritis index were significantly decreased. 2. In the AIPR-HA group, the levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IgG, IgM, Anti-collagen II in serum of the CIA mouse were significantly decreased. 3. In the AIPR-HA group, the levels of IFN- γ , IFN- γ /IL-4 in spleen cell culture of the CIA mouse were significantly decreased. 4. In the Hematoxylin and eosin stain, the cartilage destruction and synovial cell proliferation were decreased in the AIPR-HA group. 5. In the Masson's trichrome stain, the collagen fiber expressions were similar with that of the Normal group. 6. In the AIPR-HA group, the expression ratio of CD3e⁺ to CD19⁺ cell and CD4⁺ to CD8⁺ cell were similarly maintained as Normal group in the CIA mouse lymph nodes. 7. In the AIPR-HA group, CD3e⁺/CD69⁺ cells in the CIA mouse joint and CD11a⁺/CD19⁺ cells and CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the CIA mouse lymph nodes were significantly decreased. 8. In the AIPR-HA group, CD4⁺/CD25⁺ cells were significantly decreased in the CIA mouse spleen cell and were similarly maintained as Normal group in the CIA mouse lymph nodes.

Conclusions : These results suggest that AIPR-HA at ST36 has an effect to control synovial cell proliferation and cartilage destruction in rheumatoid arthritis.

Key words : *Aconiti lateralis preparata radix*, Herbal-Acupuncture, ST36, Collagen-induced arthritis (CIA), Rheumatoid arthritis (RA)

I. 서 론

류마티오이드 관절염(Rheumatoid Arthritis, 이

하 RA)은 원인불명의 만성 全身性 炎症疾患으로, 유병률은 인구의 1%정도이다. 질병의 발생은 여성이 남성보다 약 3배 더 많이 발생하며 30대에서 40대 사이에 가장 빈번하고 80%의 환자가 35세에서 50세 사이에 질병이 생기는 것으

· 교신저자: 이 현, 대전광역시 동구 용운동 963 대전대학교 한의과대학 침구학교실, Tel. 042-280-2647, Fax. 042-280-2610, E-mail: lh2000@dju.ac.kr

· 투고: 2006/05/22 · 심사: 2006/06/08 · 채택: 2006/06/19

로 알려져 있다¹⁾.

RA의 원인은 정확히 밝혀지지 않았으나, 가설적인 원인으로는 감염설, 비타민 결핍증, 호르몬의 부조화와 면역학적 반응으로 나뉘어지며, 그중 자가면역학적 반응이 가장 유력한 이론이다²⁾.

한의학적으로 痺症, 風痺, 痛風, 歷節風, 白虎風, 白虎歷節風 등의 범주에 속하는데³⁾, 原因은 內因과 外因이 있으며, 外因으로 風寒濕의 六淫之氣, 環境의인 要素와 內因으로는 七情과 臟腑의 不均衡으로 因하여 痰濕과 瘀血의 病理的 產物이 關與한다고 하여⁴⁾ 祛風散寒, 除濕清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 方法으로 치료하고 있다⁵⁾

류마토이드 관절염 연구를 위한 대표적인 병태모델은 류마토이드 관절염과 유사한 Collagen 유발 관절염(Collagen-induced arthritis, 이하 CIA)모델⁶⁾이며 세포성 면역반응 뿐만 아니라 체액성 면역반응에도 관여되는 것으로 알려져 있다⁷⁾

최근 류마토이드 관절염에 대한 藥鍼 실험 연구가 활발히 이루어지고 있어서, 澤蘭⁸⁾ 赤芍藥⁹⁾, 木防己¹⁰⁾의 藥鍼液이 collagen 誘發 關節炎에 유효하다고 보고된 바 있다. 또한 附子¹¹⁾는 散寒除濕, 溫中止痛하여 임상적으로 류마토이드 관절염에 많이 활용되는데, 鄭¹²⁾은 附子藥鍼을 이용한 Adjuvant 關節炎에 懸鍾穴을 사용한 연구에서 消炎鎮痛의 효과가 있음을 보고하였으나, CIA 모델을 이용한 면역조절에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 附子藥鍼을 CIA 생쥐의 足三里(ST36)에 시술하여, 류마토이드 관절염에 관련된 여러 Cytokine, 관절염발병율과 관절염지표, 관절의 조직학적 변화, 면역세포의 발현 등을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 材料

1) 動物

동물은 6~7週齡의 雌性 DBA/1J 생쥐를 Slc(Japan)에서 공급받아 실험 당일까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일 간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

實驗에 사용된 附子(*Aconiti lateralidis Preparata Radix*; 이하 AIPR로 표기)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

3) 藥鍼液의 製造

분쇄기를 이용해서 附子 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 圓形 三角 flask에 넣고 蒸溜水 500ml를 加하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 이 濾過液을 濾過紙로 3회 여과한 후, rotary evaporator로 감압농축 하였다. 이 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 加하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축 하한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 加하고 교반한 후 방치하였다가 濾過하는 操作을 2회 反覆하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH6.8이 되도록 조절하고, 저온에

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

서 12시간 방치한 후 멸균하였다. 멸균된 농축액에 인산완충생리식염수(PBS)를 加하여 1%로 희석하여 약침액으로 사용하였다

2. 方法

1) *in vitro*

(1) 細胞毒性 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법¹³⁾을 응용하여 실험하였다.

① Mouse lung fibroblast cell(mLFC) 배양

BALB/c 생쥐의 lung 조직을 차게 한 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고 tube에 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; containing collagenase A(5mg/ml)와 DNase type(0.15mg/ml), antibiotics (penicillin 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25µg/ml)을 넣고 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간 배양한 후 PBS로 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. DMEM-10% FBS에 일주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

② SRB assay 법

mLFC 세포는 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 附子藥鍼液(0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%)을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50µl를 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기

중에서 건조하였다. 각 well당 100µl씩 SRB (0.1% acetic acid)용액을 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid로 4회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 각 well당 100µl씩 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 5분간 shaking 한 후 흡광도(540nm)를 측정하였다.

2) *in vivo*

(1) Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model

Collagen type II(CII)를 0.05N acetic acid로 녹여 2mg/ml로 만들고, 같은 양의 Freund's complete adjuvant(FCA)로 혼합하여 2ml로 만들어, 이 용액에 녹아 있는 CII의 농도가 1mg/ml이 되도록 하였다.

DBA/1J 생쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 Normal군, Control군, Saline군, NP(needle prick)군, 부자약침(AIPR-HA)군의 5군으로 나누고, Normal군을 제외한 각 군에 CII를 2차(0일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1ml(CII 100µg)의 CII를 꼬리 기저부에 접종하였다¹⁴⁾(Fig. 1).

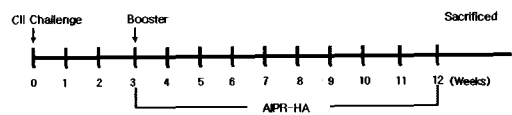


Fig. 1. Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model

(2) 취혈

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 右側 足三里(Joksamni; ST36)에 相應하는 부위를 취하였다.

(3) 처치

Control군은 CII 접종 이외의 처치는 하지 않았다.

Saline군은 C II 2차 접종 이후부터 Saline 0.2 ml를 주 3회 足三里(ST36)에 주입하였다.

NP(needle prick)군은 C II 2차 접종 이후부터 주 3회 足三里(ST36)에 26G 주사침을 0.5cm 정도 깊이로 刺入하여 자극하였다.

附子藥鍼(AIPR-HA)군은 CII 2차 접종 이후부터 右側 足三里(ST36)에 1%의 附子藥鍼液(AIPR-HAS) 0.2ml를 주 3회 注入하였다.

(4) 關節炎 發病率 分析 및 指標 (AI : Arthritis Index)

CII 2차 접종 1주일 후부터 1주일 간격으로 각 실험군의 DBA/1J 생쥐의 다리를 관찰하여 관절염 유발 정도를 기록하였다. 아래의 기준을 바탕으로 관절염 징후를 관찰하여 발병율(incidence; %) 및 관절염 지표(AI)를 계산하였다¹⁵⁾.

Incidence(%)=(각 단계의 관절염이 유발된 동물 수/전체 동물 수)×100

Arthritis Index = 유발된 동물의 단계별 관절염 지수의 합 / 전체 동물 수

degree 0 = no arthritis

degree 1 = low degree of arthritis

degree 2 = light swelling

degree 3 = medium swelling

degree 4 = severe swelling

degree 5 = severe swelling and non-weight bearing

(5) Cell culture and cell proliferation assay

脾臟組織을 적출하여 차게 한 D-PBS로 3회 세척한 후 40µm nylon mesh에 갈아서 脾臟細胞를 얻었다. 脾臟細胞를 5% fetal bovine serum 과 antibiotics(penicillin 100U/ml, streptomycin 100µg/ml)가 포함된 RPMI 1640 medium (Sigma, USA) 넣어서 5×10⁶ cells/ml 농도로 맞추고 50µg/ml의 CII 또는 anti-CD3/CD28 抗體

가 coating되어 있는 96 well plate에 分株하여 37℃ CO₂ 培養基에서 48時間동안 배양하였다. 培養 후 遠心分離 하여 上層液만을 분리하였고 上層液 중에 분비된 cytokines을 EILSA法을 이용하여 측정하였다. Cell proliferation은 細胞培養 후 각 well 에 ³H-thymidine 0.25µ Ci 넣어 37℃ CO₂ 배양기에서 8시간동안 배양한 후 측정하였다¹³⁾.

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

ELISA Kit를 사용하여, 생쥐에서 분리한 serum 및 spleen cell culture supernatant 에서 각 cytokine량을 측정하였다. 항cytokine 항체가 코팅된 96 well plate에 serum을 加하여 반응시킨 후 4번 세척하고, 다시 biotin이 표식된 항cytokine 항체를 加하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 加하고 ELISA-reader를 이용하여 측정하였다.

(7) Histological analysis

DBA/1J 생쥐의 다리 관절 부위를 취하여 Cryotome을 이용하여 절편한 후, Hematoxylin and eosin staining(DakoCytomation, Japan)과 Masson's trichrome 염색(DakoCytomation, Japan)을 하였다.

(8) Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis

① Lymph node 細胞 분석

각 군에서 절취한 lymph node에서 세포를 분리하여 표식항체를 반응시켜 Flow cytometer로 분석하였다.

② 관절내 세포 분석

생쥐에서 분리해 낸 다리관절을 잘게 절단한

附子藥鉞이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

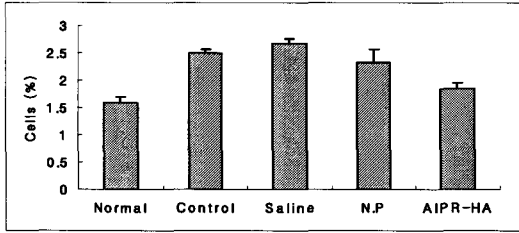


Fig. 2. The cytotoxicity of AIPR-HAS on mice lung fibroblasts

후 collagenase를 加하고 배양하여 분리해 낸 세포에 표식항체를 반응시켜 Flow cytometer로 분석하였다.

(9) 통계처리

통계처리 및 분석은 SPSS(Statistical Package for Social Science) for Windows Ver.10.0 프로그램을 사용하였으며, 모든 결과는 Mean±SEM으로 표시하였다. 각 군간의 비교는 ANOVA test를 이용하였고, p값이 0.05이하를 유의한 수준으로 보았다.

Ⅲ. 성 적

1. In vitro

1) 세포독성 측정

세포의 생존율은 AIPR-HAS 농도 1%에서 가장 높은 생존율을 보였다(Fig. 2).

2. In vivo

1) 관절염 발병을 분석

AIPR-HA군의 관절염 발병률이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig.3).

2) 관절염 지표(AI)

관절염 지표(AI)는 C II 1차 접종을 시점으로

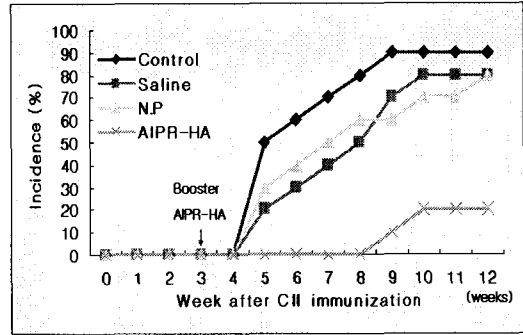


Fig. 3. Effects of AIPR-HA on the murine CIA incidence

12주 동안 관찰하였다. AIPR-HA군의 관절염 지표(AI)가 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 4).

3) ELISA analysis

(1) IL-6 in serum

혈청내 IL-6는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

(2) IFN-γ in serum

혈청내 IFN-γ 는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

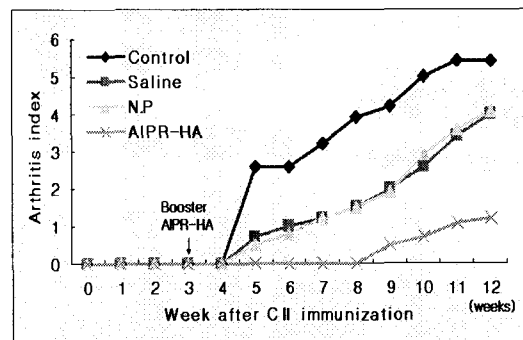
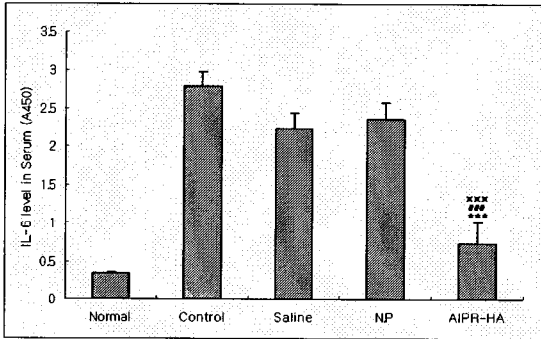
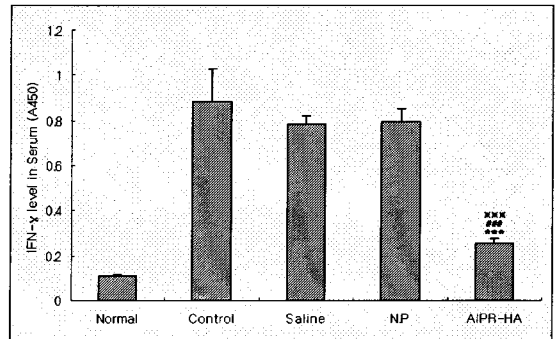


Fig. 4. Effects of AIPR-HA on the murine CIA arthritis index

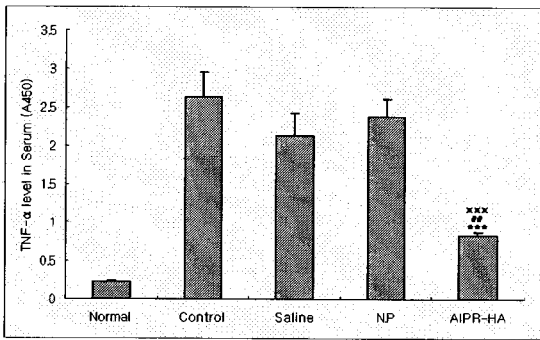
Fig.5. ELISA analysis



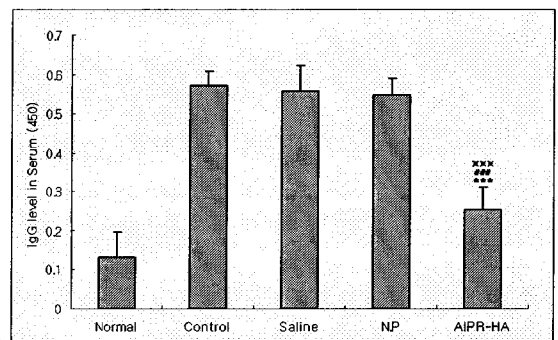
(A) The level of IL-6 in CIA mouse serum



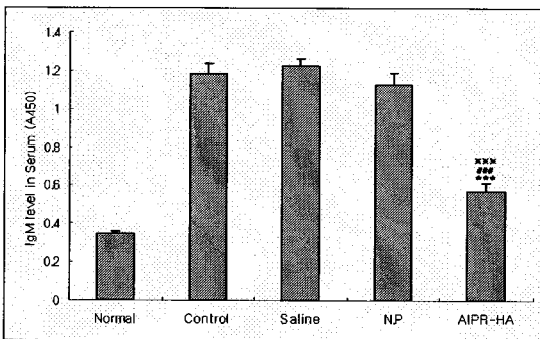
(B) The level of IFN- γ in CIA mouse serum



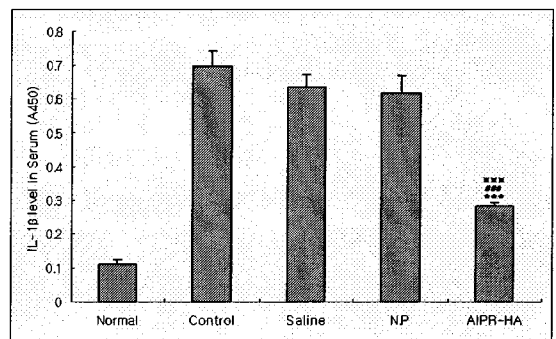
(C) The level of TNF- α in CIA mouse serum



(D) The level of IgG in CIA mouse serum

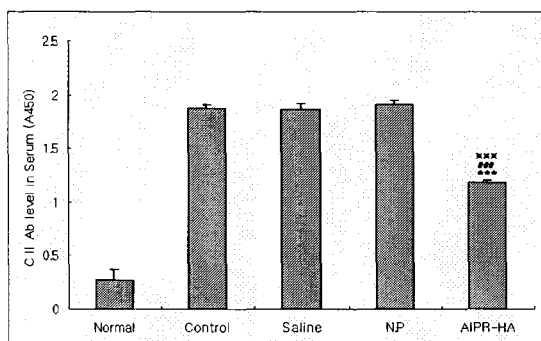


(E) The level of IgM in CIA mouse serum

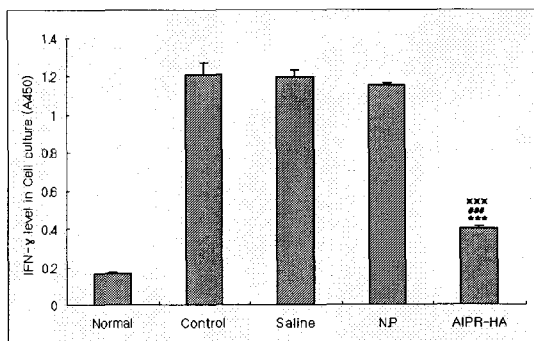


(F) The level of IL-1 β in CIA mouse serum

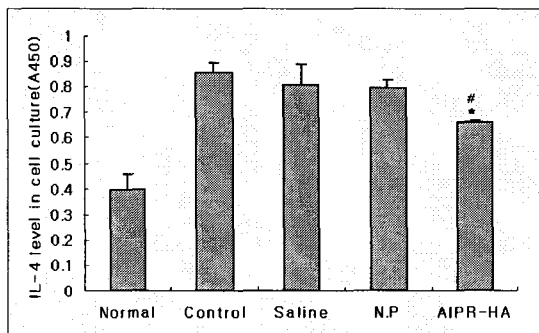
Fig.5. ELISA analysis



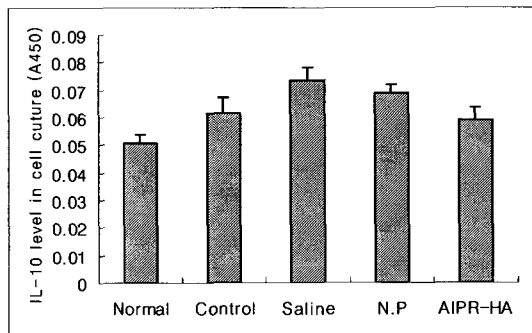
(G) The level of CII Ab in CIA mouse serum



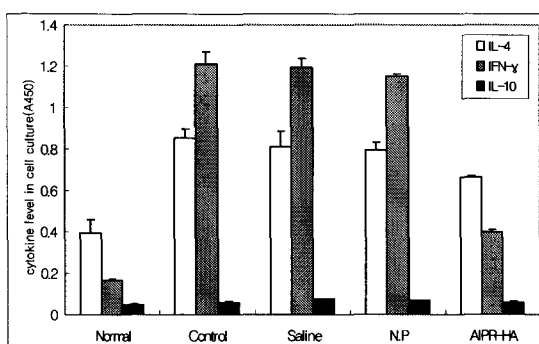
(H) The level of IFN- γ in CIA mouse spleen cell culture



(I) The level of IL-4 in CIA mouse spleen cell culture



(J) The level of IL-10 in CIA mouse spleen cell culture



(K) IFN- γ /IL-4 and IFN- γ /IL-10 in CIA mice spleen cell culture

(3) TNF- α in serum

혈청내 TNF- α 는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

(4) IgG in serum

혈청내 IgG는 AIPR-HA군이 Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

(5) IgM in serum

혈청내 IgM은 AIPR-HA군이 Control군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

(6) IL-1 β in serum

혈청내 IL-1 β 는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

(7) Anti-collagen II in serum

혈청내 Anti-collagen II는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

(8) IFN- γ in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 내에서 IFN- γ 는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

(9) IL-4 in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 내에서 IL-4는 AIPR-HA군이 Control군 및 Saline군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

(10) IL-10 in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 내에서 IL-10는 AIPR-HA군이 Control군 및 Saline군에 비하여 약간 감소하기는 하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

(11) IFN- γ /IL-4 and IFN- γ /IL-10 in CIA mouse spleen cell culture

Normal spleen cell culture supernatant 에서는 IL-4가 IFN- γ 의 2배 가량 되었으나 control 군에서는 IFN- γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 반면 AIPR-HA군에서는 IFN- γ 가 현저하게 감소하여 IL-4가 IFN- γ 보다 높은 수치를 나타내었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다 (Fig. 5).

4) Histological analysis

(1) Hematoxylin and eosin stain

AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 연골의 파괴와 활막의 증식이 감소되었다(Fig. 6).

(2) Masson's Trichrome stain

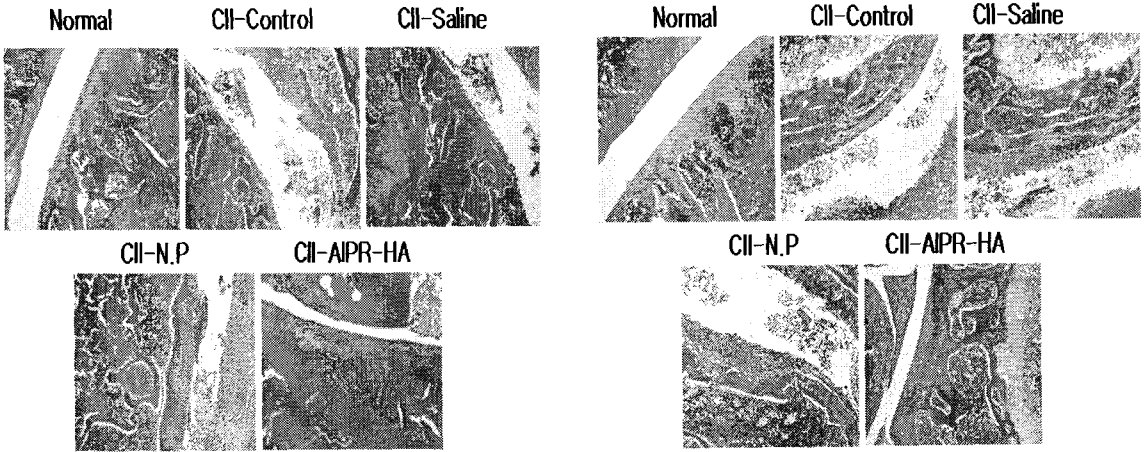
조직학적으로 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 collagen fiber가 정상에 가깝게 유지되었다(Fig. 6).

5) Fluorescence-activated cell sorter 분석

(1) CD3e⁺ 및 CD19⁺ cell percentage in lymph node

임파절에서 T세포와 B세포의 비율을 알아보고자 CD3e⁺세포와 CD19⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 정상군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

Fig. 6. Histological analysis



(A) Histological analysis of the sections from mouse joint

(B) Histological analysis of the mice joint sections from mouse joint

(2) CD4⁺ 및 CD8⁺ cell percentage in lymph node

임파절에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보기 위하여 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 정상군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

(3) CD3e⁺/CD69⁺ cell percentage in joint

관절내 활성화된 T세포수의 변화를 알아보기 위하여 CD3e⁺/CD69⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

(4) CD11a⁺/CD19⁺ cell percentage in lymph node

임파절내 활성화된 B세포수의 변화를 알아보기 위하여 CD11a⁺/CD19⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

(5) CD11b⁺/Gr-1⁺ cell percentage in lymph node

관절내 염증성 과립구수의 변화를 알아보기 위하여 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 감소하였다(Fig.7).

(6) CD4⁺/CD25⁺ cell percentage in spleen

비장세포에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포는 AIPR-HA군이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

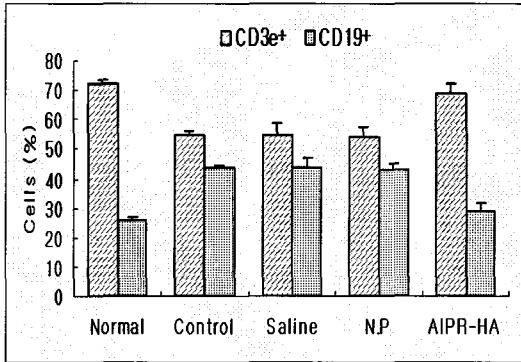
(7) CD4⁺/CD25⁺ cell percentage in lymph node

임파절에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포는 AIPR-HA군이 정상군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

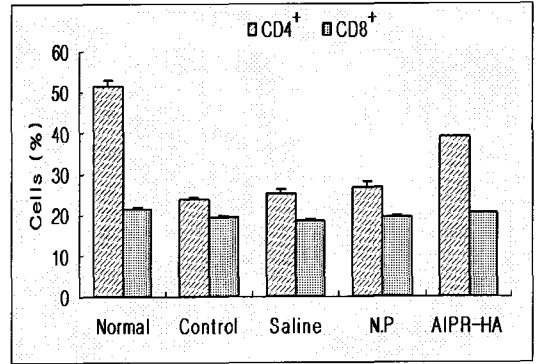
IV. 고찰

만성관절염에 속하는 RA는 확실한 원인이 알

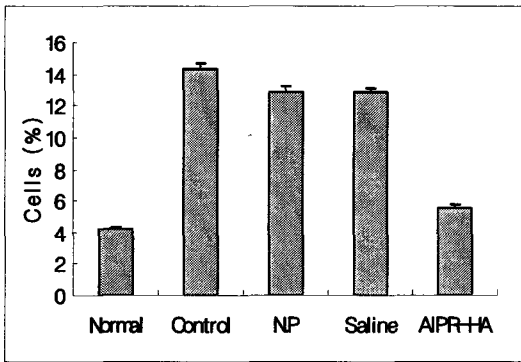
Fig. 7. Fluorescence-activated cell sorter 分析



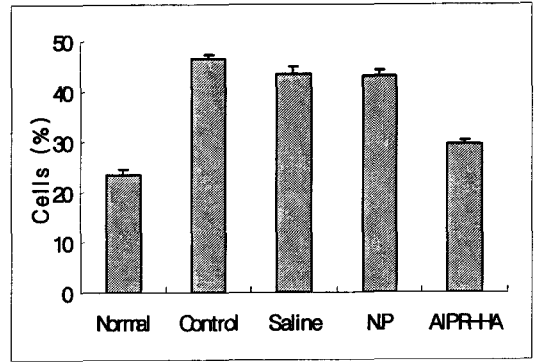
(A) Effects of AIPR-HA on expression of CD3e⁺/CD19⁺ in CIA mouse lymph node



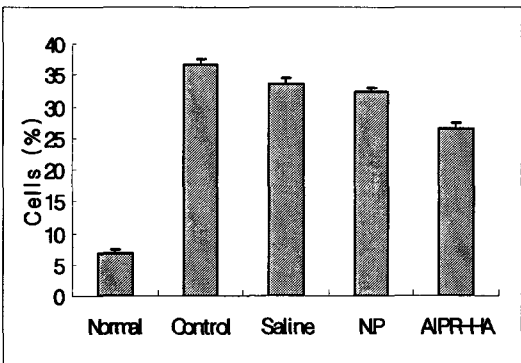
(B) Effects of AIPR-HA on expression of CD4⁺/CD8⁺ in CIA mouse lymph node



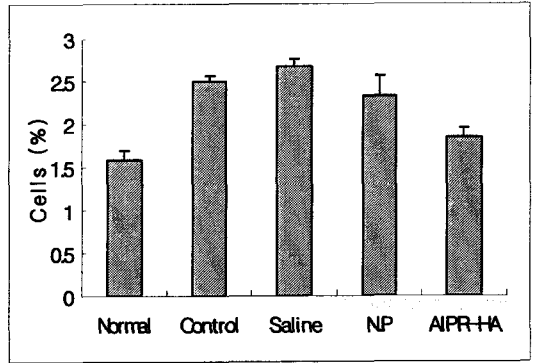
(C) Effects of AIPR-HA on expression of CD3e⁺/CD69⁺ in CIA mouse joint



(D) Effects of AIPR-HA on expression of CD11a⁺/CD19⁺ in CIA mouse lymph node

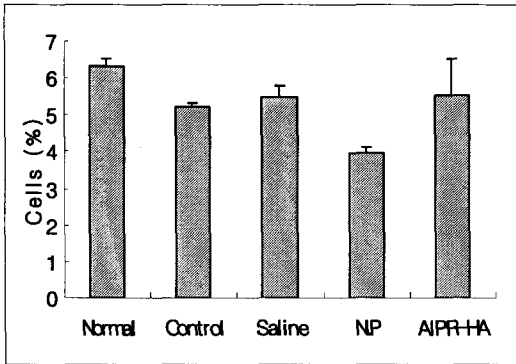


(E) Effects of AIPR-HA on expression of CD11b⁺/Gr-1⁺ in CIA mouse lymph node



(F) CD4⁺/CD25⁺ cell percentage in spleen

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향



(G) Effects of AIPR-HA on expression of CD4⁺/CD25⁺ in CIA mouse lymph node

려지지 않은 전신질환으로 滑液膜에 慢性的肥大와 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직을 파괴하여 초기에는 관절의 浮腫과 疼痛을 초래하나 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발되고 이외에 皮膚筋肉, 骨, 眼球, 心臟, 血管, 肺 등 많은 關節의 臟器組織에 病變을 유발할 수 있으며 관절 중에서는 특히 손과 발의 小關節 및 膝關節 등을 多發的, 對稱的으로 침범하는 특징적 소견을 가진다¹⁶⁾.

RA의 원인은 유전, Virus의 감염 등 특히 외부인자가 면역반응을 유도하고 特定人에서 이 면역반응이 증폭되고 지속된다는 가설과 Immunoglobulin G에 대한 항체가 발견되는 것으로 보아 면역 항체 생성을 조절하는 세포의 제어에 일차적인 이상이 있다는 자가면역질환이라는 가설 등이 있으나 아직까지 완전히 규명되지 못한 상태이며, 치료면에 있어서도 여러 가지 약물요법등이 사용되고 있지만 질병을 완치시키거나 진행을 막을 수 있는 확실한 방법이 없는 실정이다¹⁷⁾.

그 증상은 매우 다양하며, 보통 수 주나 수개월에 걸쳐 관절통과 강직 증상이 서서히 나타나게 된다. 주로 肘, 腕, 肩, 膝 그리고 中足骨이 포함되며 時間이 지나면서 腫脹과 疼痛이 증가한

다. 관절에 대한 증상으로는 疼痛, 浮腫, 關節強直, 運動制限 및 機能消失 등이 나타나며^{2,18)}. 全身 症狀으로는 倦怠感, 疲勞感, 輕度の 發熱 및 淋巴腺腫大가 나타날 수 있다. 20~25%의 환자에서는 皮下 結節을 觀察할 수 있는데 주로 하층을 받게 되는 關節 주위부에 생기고 血清 RF(Rheumatoid Factor) 및 심한 관절 손상과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 임상적으로 드물게 心囊炎, 胸膜炎이나 미만성 間質性肺炎, 神經 압박에 의한 神經 症狀, 眼球乾燥症, 鞏膜炎 등이 나타날 수 있다¹⁸⁾.

RA의 임상 과정은 매우 다양하고 예측할 수 없으며, 대부분의 환자는 질환이 지속되나 활동도(activity)의 변동을 보이며, 다양한 관절 변형을 수반한다¹⁾.

그 치료에 있어서는 藥物療法, 保存療法, 그리고 手術療法로 나누는데²⁾, 그 主要 治療目的은 첫째, 疼痛의 緩和, 둘째, 炎症의 減少, 셋째, 機能的 能力 保存, 넷째, 原因-病因的(epipathogenic)과정의 완화, 다섯째, 치유를 容易하게 하는데 있으며, 最近에는 症勢緩和와 關節構造의 손상을 막기 위해 비특이적인 소염 혹은 면역과정 완화를 주로 하는 약제들을 주로 사용하고 있다¹⁾.

그 발병기전은 어떠한 원인에 의해 미세혈관의 손상과 활막 배열세포가 증가되면 단핵구가 증가하게 되는데 주로 림프구로 구성되며 이 중 T4 helper(helper T cell) 림프구가 가장 많고 HLA-DR+(Human leukocyte antigen-D-related, 인간 백혈구 항원)인 대식세포 등도 증가한다. T와 B림프구 및 대식세포가 활성화되면서 다양한 cytokine들을 분비하고 RF(Rheumatoid factor)를 생산하게 되어 세포 및 체액 면역반응이 모두 관계하는 것으로 보인다. 특히 T4 림프구의 억제시 염증이 호전되는 점으로 미루

어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 활막에서의 여러 효소, pannus, 그리고 분비된 cytokine 들 중, 특히 interleukin-1과 TNF(tumor necrosis factor) 등은 pannus에서 collagen 분비 효소를 분비하며, 연골 세포에서 단백 분해효소를 내어 골과 연골의 파괴를 가져온다¹⁸⁾.

RA는 韓醫學的으로痺症, 風痺, 痛風, 歷節風, 白虎風, 白虎歷節風 등의 범주에 속하는데³⁾, 특히痺症은 《黃帝內經痺論》¹⁹⁾에 “風寒濕三氣雜至 合而爲痺也 其風勝者爲行痺 寒氣勝者爲痛痺 濕氣勝者爲着痺”라고 하여 風寒濕 三氣가痺症의 重要한 原因이라고 언급하고 있으며, 《金匱要略》²⁰⁾에서는 “短氣自汗出歷節疼不可屈伸 此皆飲酒汗出當風所致”라 하였고, 《鍼灸聚英》²¹⁾에서 痛風의 原因은 風熱, 風濕, 血虛有痰이라 하였고, 《醫學入門》²²⁾에서 “痛風…形怯瘦者多內因 血虛有火 形肥勇者 多外因 風濕生痰 以其循歷遍身 曰歷節風 甚如虎咬 曰白虎風”, “痛多痰火 腫多風濕然”이라 하였고, 《景岳全書》²³⁾에서 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得而 勝之而爲痺”라 하였고, 《醫林改錯》²⁴⁾에서는 瘀血說을 주장하였으며, 《血證論》²⁵⁾에서 “身體不仁 四肢疼痛 今名痛風 故曰痺證 虛人感受外風 客於脈分則爲血痺”라 하였다.

藥鍼療法은 穴位注射療法, 水鍼療法이라고 하며 經絡學說의 원리에 의거하여 有關한 혈위나 압통점 혹은 체표의 촉진으로 얻어진 陽性反應點에 精製된 各種藥物을 주입하여 自體효과와 藥물의 藥理작용을 통하여 生體의 功能을 調整하고 疾病의 治療효과를 높이는 新鍼療法이다²⁶⁾.

本 實驗에서 藥鍼製劑로 사용한 附子(*Aconiti lateralidis preparata radix*)는 毛茛科(미나리아재비과 ; *Ranunculaceae*)에 속한 多年生 草本인 附子의 子根으로 性은 熱 有毒하고 味는 辛甘하

다. 주로 心, 脾, 腎經으로 歸經하며, 回陽補火, 散寒除濕 등의 效能이 있어 踈撻拘攣, 陰盛格陽, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 陰疽瘡漏 등을 치료한다고 하였다¹¹⁾. 또한 止痛作用, 溫中燥濕作用, 強心回蘇作用, 興奮刺戟作用, 強心利尿作用이 있다⁴⁰⁾.

痺症을 치료하는 治療穴에는 陰陵泉, 陽陵泉, 足三里, 申脈, 照海, 委中, 中脘, 環跳 등으로²⁴⁾, 그중에서도 臨床的으로 가장 많이 활용되고 主治範圍가 廣範圍한 足三里(ST36)는 足陽明胃經의 合土穴으로써 回陽九鍼穴, 六腑下合穴, 四總穴, 中風七處穴의 하나로써, 주로 消化器系統疾患이 대표적이고 循環呼吸泌尿生殖系統病證 등에 양호한 효과를 나타내며 全身強壯의 要穴이다. 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血의 效능이 있어 脚氣, 下肢麻痺, 膝關節痛, 膝無力, 下肢痛, 坐骨神經痛, 虛勞 등 主治範圍가 광범위하다²⁴⁾. 이에 저자는 주치범위가 광범위하고 슬관절질환에 효과가 좋은 足三里를 선택하여 실험하였다.

관절염의 실험모델은 유발물질에 따라 여러 유형이 있는데 그 유발물질로는 adjuvant, 제Ⅱ형 collagen(collagen II, CⅡ), lipopolysaccharide, carrageenin, peptidoglycan polysaccharide 등이 있으며 최근에는 주로 제Ⅱ형 collagen을 이용한 실험이 진행되고 있다²⁴⁾.

최근 제Ⅱ형 collagen 유발 관절염에 대한 약침 실험 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 澤蘭⁸⁾, 赤芍藥⁹⁾, 木防己¹⁰⁾ 등의 藥鍼液이 collagen 유발 관절염에 유효하다고 報告된 바 있으나, 散寒除濕, 強心止痛, 通經活絡의 效능을 가진 附子藥鍼에 대한 實驗 報告는 接할 수 없었다.

이에 著者는 散寒除濕, 強心止痛, 通經活絡 效능이 있는 附子로 藥침액을 제조한 후, Collagen-induced arthritis (CIA) mouse의 足三里(ST36)에 附子藥鍼을 施術하여, 류마티오이드 관

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

절염과 관련된 各種 cytokine 및 免疫細胞를 분석하여, 염증반응 및 면역억제에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 實驗에 있어 *in vitro*에서 滑膜細胞에 대한 細胞毒性을 알아보기 위하여, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%의 附子 藥鍼液을 이용한 실험 결과, 약침농도 1%에서 가장 높은 細胞 生存率을 보여(Fig. 2), 1% 附子藥鍼液을 실험에 사용하였다.

*in vivo*에서 관절염의 발병률을 분석한 결과, CII 2차 접종인 21일 이후부터 關節炎이 발병하기 시작하였고, 附子藥鍼群에서는 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 3).

또한, CII 1차 접종을 시점으로 12주 동안 關節炎 指標(AI)를 계산한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 4).

RA의 발생에 있어 세포성 면역반응은 주로 T 림프구에 의하여 이루어지나, NK세포와 大食細胞들에 의해 이루어지기도 하며, 이들 세포 간에는 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

Cytokine은 선천면역과 적응면역에 관여하는 세포에서 분비되는 蛋白質이며, 이들은 세포의 여러 기능들을 조절한다. cytokine은 미생물과 여러 가지 抗原에 대한 반응으로 생성되며 여러 종류의 cytokine이 免疫과 炎症反應에 연관된 세포들의 다양한 반응을 유도하며 또한 조혈세포들의 성장을 자극한다. 臨床에서 cytokine은 많은 免疫疾患과 炎症疾患에서 중요한 치료제로서 또는 특이한 길항제에 대한 표적으로서 중요한 물질이다²⁹⁾.

IL-6는 다기능 cytokine으로서 관절 내 염증 반응을 촉진시키기도 하고 억제시키기도 하며

침윤한 염증세포의 증식에 중요한 역할을 하는데³⁰⁾, 선천면역과 적응면역 모두에서 기능을 하는 cytokine이다²⁹⁾. 선천면역에서 간세포의 급성 단계 단백질(acute-phase protein)합성을 자극하여 염증의 전신적 효과를 야기시키고, 적응면역에서는 항체 생성자로 분화되어 가는 B림프구의 성장을 자극한다²⁹⁾.

IFN- γ 는 주요한 큰포식세포-활성화 cytokine이고 선천면역과 세포매개 특이면역에서 중대한 역할을 하며, 약간의 항바이러스성 활성을 가지고 있지만 강력한 항바이러스성 인터페론은 아니며, 주된 면역반응의 작동 cytokine으로서 기능을 한다²⁹⁾.

TNF- α (종양괴사인자 ; tumor necrosis factor)는 그람음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성 염증반응의 주된 매개자이며 많은 중증 감염의 전신적 합병증의 원인이 된다²⁹⁾.

본 실험에서 혈청내 IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 를 조사한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 有意性 있게 減少한 것으로 보아, 附子藥鍼이 항염증 효과가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

RA 환자는 혈중에 자신의 IgG 분자의 Fc 분절(드물게는 Fab)과 반응하는 IgM 또는 IgG 항체를 가지고 있다. 이러한 자가항체를 류마티스 인자(rheumatoid factor, RF)라 부르며, 그들의 존재 여부가 RA에 대한 진단에 사용된다²⁹⁾.

본 실험에서, 혈청내 IgG와 IgM 양이 附子藥鍼群에서 Saline군 및 NP군에 비하여 유의성 있게 감소($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)하였다(Fig. 5).

IL-1은 滑液膜의 내막하층의 대식세포에 의해서 분비되며, lysosomal enzyme을 분비하여 연골세포를 손상시킨다³¹⁾. 그 주요 기능은 TNF와 비슷하게 감염에 대한 숙주의 염증반응과 다

른 염증성 자극의 매개자로서의 역할이다²⁹⁾. IL-1에는 IL-1 α 와 IL-1 β 가 존재하는데 IL-1 α 는 B림프구와 IL-1 β 는 T림프구와 각각 더 친화력이 있으며 혈청 내에는 주로 IL-1 β 가 존재한다³²⁾.

본 실험에서, 혈청 내 IL-1 β 의 양이 附子藥鍼群에서 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소(P<0.001, P<0.001, P<0.001)한 것으로 보아, 附子藥鍼이 항염증 효과가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

Anti-collagen II는 collagen II에 대한 항체로 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성있게 감소(P<0.001, P<0.001, P<0.001)하였다(Fig. 5).

IL-4는 IgE 항체의 생성과 미감작 CD4⁺ 보조 T세포로부터 Th2 세포 발생을 위한 주요 자극제로서, IFN- γ 의 큰포식세포-활성화효과를 길항해서 세포매개 면역반응을 저해한다²⁹⁾.

CIA mouse spleen cell culture supernatant 내에서의 IFN- γ 와 IL-4는 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 유의성 있게 감소(P<0.001, P<0.001, P<0.001)한 것으로 보아 附子藥鍼이 항염증 효과가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

Normal spleen cell culture supernatant에서는 IL-4가 IFN- γ 의 2배 가량 되었으나 control군에서는 IFN- γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 반면 附子藥鍼群에서는 IFN- γ 가 현저하게 감소하여 IL-4가 IFN- γ 보다 높은 수치를 나타내었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다(Fig. 5).

관절 조직의 구조를 알아보기 위해 Hematoxylin and eosin stain을 이용하여 관찰한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 軟骨의 破壞와 滑膜의 增殖이 減少되

었다(Fig. 6).

또한 교원질 섬유를 알아보기 위해 Masson's trichrome stain을 이용하여 관찰한 결과, 組織學的으로 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 collagen fiber가 정상에 가깝게 유지되었다(Fig. 6).

RA의 병리과정에는 T cell이 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며³³⁾, 체액성 면역 및 세포성 면역반응에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다³³⁾. T세포는 기능에 따라 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell, Tc)와 보조 T 세포(helper T cell, Th)로 나뉜다. 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell, Tc)는 세포 표면에 CD8 항원을 가지고 있으며, 세포질이 감염된 숙주세포를 사멸시키고, 보조 T 세포(helper T cell, Th)는 세포 표면에 CD4 항원을 가지고 있으며, 기능에 따라 염증성 Th1 세포(inflammatory Th1 cell)과 보조 T 세포('true' T cell)로 분류한다⁴¹⁾. Th1세포와 Th2세포는 서로 다르면서 중복되는 cytokine을 분비하지만 면역반응에서는 서로 다른 작용을 나타낸다. Th1 세포는 대식세포를 활성화시키는 cytokine인 IFN- γ 를 분비하고, 대식세포를 활성화시키면서 B세포를 억제하고 일부 세포에서 직접적인 세포독성을 나타내는 림프독소(lymphotoxin, LT- α 또는 TNF- β)를 분비한다. Th2 세포는 IL-4와 IL-5를 분비하여 B세포를 활성화시키고 대식세포의 활성화를 억제하는 IL-10을 분비한다. Th1과 Th2 세포의 전구세포인 Th0세포는 IL-2, IL-4, IFN- γ 와 같은 cytokine을 분비하며 독특한 작용을 가진다³⁴⁾.

CD3e 세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 있으며 항원인식 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 하고³⁵⁾, CD19 세포는 B세포의 수를 측정하는데 주로 사용하며, 항체를 직

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

접 생산하여 외부물질을 중화시키는 체액성 면역반응에 관여한다³⁶⁾.

림바節에서 CD3e⁺細胞와 CD19⁺細胞의 比率은 T세포와 B세포의 비율을 관찰한 것으로, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 정상군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

TCR(T cell receptor)은 MHC(Major histocompatibility complex, 주조직적합성 복합체) 분자와 결합하여 세포 표면에 발현된 펩타이드를 인식한다. 이때 펩타이드와 결합하는 MHC는 Class I MHC와 Class II MHC, 두가지로 나뉜다. Class I MHC는 모든 유핵세포의 표면에 발현되며, CD8 T 세포 (세포독성 T 세포, cytotoxic T cell)의 TCR에 의해 인식된다. Class I MHC 분자는 세포질 내에 있는 펩타이드와 결합하여 세포표면으로 발현되고 CD8과 결합한다. 이와는 달리 Class II MHC는 항원제공세포 (antigen-presenting cell), 대식세포, B 세포 및 지상돌기세포(dendritic cell), 그리고 랑게르한스 세포(Langerhans cell)등의 유핵세포들 표면에 발현되며, CD 4세포(Th 세포)의 TCR에 의해 인식된다. Class II MHC 분자는 소포체(vesicular compartment)내에 있는 펩타이드와 결합하여 세포표면으로 발현되고 CD4와 결합한다⁴¹⁾.

림바節에서 CD4⁺細胞와 CD8⁺細胞의 比率은 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 관찰한 것으로, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 정상군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

CD3e세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관되어 있으며³⁵⁾, CD69는 휴지기 임파구에서는 발현되지 않지만, T 세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화자로 불리는

세포표면 단백질이다³⁷⁾.

關節내 활성화된 T세포수의 변화를 알아보고자 CD3e⁺/CD69⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 7).

CD11a는 백혈구에서 발현되고, CD18과 짝을 이루며 세포의 이동작용을 하며, CD19는 B세포에 분포하면서 B세포 수용체의 협조자(Co-B cell Receptor)이며, CD21과 복합체를 이루어信號 形質流入의 역할을 한다³⁷⁾.

임파節내 CD11a⁺/CD19⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 현저하게 감소하여, 附子藥鍼이 CIA mouse의 림바節내 활성화된 B세포수를 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 7).

CD11b 세포표면 표식인자는 단핵세포, 과립구, NK세포에서 발현되는데 이 세포들은 염증시에 제일 먼저 도착하는 혈구들로서 신체에 침투한 항원에 대한 탐식작용을 하며³⁷⁾, Gr-1세포에 강한 양성반응을 보이는 세포들은 과립백혈구들이다³⁸⁾.

關節내 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 현저하게 감소하여, 附子藥鍼이 CIA mouse의 관절내 염증성 과립구수를 감소시켰음을 알 수 있었다.(Fig. 7).

CD4는 조력 T세포(helper T cell)이며, CD25는 활성화된 T세포를 말하는 것으로³⁹⁾. 脾臟細胞에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율은 附子藥鍼群이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

림바節에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율은 附子藥鍼群이 正常群과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 7).

以上の 實驗結果를 종합하여 보면, Collagen

유발 관절염 생쥐의 足三趾 附子藥鍼은 류마티드 관절염에 관련된 여러 Cytokine, 관절염 발병율과 관절염지표, 관절의 조직학적 변화, 면역세포의 발현 등과 관련하여 유의한 효과가 있는 결과이므로, 동물실험을 근거로 인간의 류마티드 질환과 관련된 臨床的 적용을 위해 향후 지속적 研究가 필요할 것으로 思料된다.

V. 결 론

附子藥鍼이 Collagen-induced arthritis에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 關節炎 發病率과 關節炎指標가 대조군에 비해 낮았다.
2. 血清內 IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 는 유의성있게 감소하였다.
3. 血清內 IgG와 IgM은 유의성있게 감소하였다.
4. 血清內 Anti-collagen II는 유의성있게 감소하였다.
5. 비장세포배양에서 IFN- γ 가 감소하여 IL-4와 비슷한 수준이 되었다.
6. Hematoxylin and eosin stain에서 軟骨의 破壞와 滑膜의 增殖이 減少되고 正常群에 유사한 構造로 회복되었다.
7. Masson's trichrome stain에서 교원질섭유가 正常群과 같이 유지되었다.
8. 淋巴節內 CD3e⁺ 細胞와 CD19⁺ 細胞의 比率, CD4⁺ 細胞와 CD8⁺ 細胞의 比率은 正常群과 유사한 비율이 유지되었다.
9. 關節內 CD69⁺/CD3e⁺ 細胞와 淋巴節內 CD11a⁺/CD19⁺ 細胞, CD11b⁺/Gr-1⁺ 細胞는 감소하였다.
10. 脾臟細胞에서 CD4⁺/CD25⁺ 細胞는 減少하였고 淋巴節에서 CD4⁺/CD25⁺ 細胞는 正

常群과 유사한 비율을 유지하였다.

이상의 결과로 足三趾 附子藥鍼은 Collagen-induced arthritis에 유효한 것으로 나타났으며 류마티드 관절염 치료에 대한 附子藥鍼의 응용과 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. 해리스 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 도서출판 정담. 1997 : 1777-85.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1992 : 109-20.
3. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1987 : 370-3.
4. 권영달, 송용선. 류머티스성 관절염에 대한 東西醫學的 考察. 대한한의학회지. 1994 ; 15(2) : 373-96.
5. 權宰植. 痺證. 서울 : 鼎談. 1993 : 207-22.
6. Durie FH, Fava RA and Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. Clinical Immunol Immunopathol. 1994 ; 73(1) : 11-8.
7. 醫學教育研修院. 症狀別 臨床 檢査. 서울 : 서울대학교 출판부. 1994 : 198-202.
8. 이준호. 택란약침이 collagen으로 유발시킨 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 287-318.
9. 성은미. 적작약약침이 관절염에 미치는 실험적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 221-50.
10. 이연경. 목방기약침이 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(4) : 125-42.
11. 전국 한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울 : 永林社. 1994 : 331-3.
12. 정선희, 박동석. 부자약침이 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(1) : 334-46.

附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

13. Vajrabhaya L, Sithisarn P, Wilairat P, Leelaphiwat S. Comparison between Sulphorhodamine-B dye staining and ⁵¹Cr-release method in cytotoxicity assay of endodontic sealers. *J Endod.* 1997 ; 23(6) : 355-7.
14. Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Canas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005 ; 7(5) : R1034-45.
15. Bauer K, Knipper A, Hoang TR, Koczan D, Kreutzer HJ, Nizze H, Mix E, Thiesen HJ, Holmdahl R, Ibrahim SM. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005 ; 7(4) : R877-84.
16. 김완희. 신생리학총론. 서울 : 경희대학교 1975 : 16.
17. 강병철. 오늘의 진단 및 치료. 서울 : 도서출판 한우리. 1999 : 875-900.
18. 서울대학교 의과대학 내과학교실편. 내과학. 서울 : 군자출판사. 1996 : 1264.
19. 張馬合註. 黃帝內經 素問. 臺北 : 大聯國風出版社. 1973.
20. 張仲景. 仲景全書. 서울 : 大星文化社. 1984 : 366-9.
21. 高武. 針灸聚英. 上海 : 上海科學技術出版社. 1978 : 32-3.
22. 李梴. 編註醫學入門. 서울 : 大星文化社. 1989 : 523, 369-71.
23. 張介賓. 景岳全書. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 248-55.
24. 王清任. 醫林改錯. 臺北 : 台聯國風出版社. 1975 : 65.
25. 唐容川. 血證論. 台北 : 力行書局有限公司. 1984 : 168.
26. 전국 한의과대학 침구경혈학교실. 침구학. 서울 : 集文堂. 1994 : 382-4.
27. 趙允亨, 金京南, 宋永商, 林榮鎬. 關節炎에 대하여 보고된 韓醫學 論文에 관한 考察. 한방재활의학과학회지. 2000 ; 11(1) : 173-91.
28. Rene Cailliet. M.D. 무릎을 침해하는 여러가지 관절염. 무릎의 동통과 기능장애. 대학서림. 1991 : 125-48.
29. Abbas AK. 세포분자면역학 5판. 서울 : 범문사. 2004 : 243-53, 261-69.
30. 문희주. 임상 혈청학. 서울 : 대학서림. 2004 : 26.
31. Frank H. Netter. M.D. The CIVA collection of medical illustration. New Jerse. 1987 : 152-65.
32. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1997 : 124-26.
33. Firesein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 33. 1990 : 768-73.
34. Charles A Janeway. 면역생물학. 서울 : 라이프사이언스. 2002 : 337-41.
35. 타다 토미오. 면역의 의미론. 서울 : 한울. 1998 : 46, 103.
36. Bruce albert et al. Molecular biology of the cell(3rd edition). New york : Garland Publishing. 1994 : 1195-7.
37. Robert R. Rich et al. Clinical immunology. New York : Mosby. 2001 ; 4(13), 6(18).
38. Fujisawa K. et al. Activation of transcription factor NF- κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor- α .

- Arthritis Rheum. 39. 1996 : 197-203.
39. Kumar V. Stellrecht K. Sercarz E .
Inactivation of CD4 regulatory T cell results
in chronic autoimmunity. Exp Med. 184.
1996 : 1609-17.
40. 신길구. 申氏本草學. 서울 : 수문사. 1988
3-29.
41. 표석능. 면역학 강의. 서울 : 자유아카데미
2003 : 100-7, 138-40.