대한침구학회지 제23권 제3호(2006년 6월)
The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society

원 저

足三里 杜冲藥鍼이 Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향

강재희 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with *Eucomiae* Cortex Solution at *Joksamni*(ST_{36}) on Collagen-induced Arthritis

Kang Jae-hui and Lee Hyun

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives : The purpose of this study is to observe the effects of *Eucomiae Cortex* herbal-acupuncture solution(EC-HAS) at Joksamni(ST36) on arthritis of mice induced by Collagen II.

Methods : The author performed several experimental items. First, it is the cell survival rate of mice lung fibroblasts. Second, it is the incidence rate of arthritis and arthritis index of CIA. Third, it is the levels of IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IgG, IgM and anti-collagen II in serum and the level of IFN-γ, IFN-γ/IL-4 ratio in CIA mouse spleen cell culture. Fourth, it is histological analysis of the mice joint. Fifth, it is expression ratio of $CD3e^+$ to $CD19^+$ cell, $CD4^+$ to $CD8^+$ cell, $CD69^+/CD3e^+$ cells, $CD11a^+/CD19^+$ cells, $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$ cells and $CD4^+/CD25^+$ cells.

Results & Conclusion : 1. In the EC-HA, the incidence of arthritis and arthritis index were significantly decreased.

2. In EC-HA, the levels of IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IgG, IgM and anti-collagen II in serum of CIA mice and the level of IFN-γ, IL-4, IFN-γ/IL-4 ratio in CIA mouse spleen cell culture were significantly decreased.

· 접수 : 2006년 5월 8일 · 수정 : 2006년 5월 20일 · 채택 : 2006년 5월 20일
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 백석동 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 041-521-7579 E-mail : lh2000@hanmir.com

3. In the histological study, the cartilage destruction and synovial cell proliferation were decreased in the EC-HA, and the collagen fiber expressions in the EC-HA were similar with that of the Normal group.

4. In the EC-HA, the expression ratio of $CD3e^+$ to $CD19^+$ cell and $CD4^+$ to $CD8^+$ cell were similarly maintained as Normal group in lymph nodes, and $CD69^+/CD3e^+$ cells and $CD11a^+/CD19^+$ cells were decreased in lymph nodes, and $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$ cells and $CD4^+/CD25^+$ cells were decreased in synovium.

These results suggest that EC-HA at ST36 has an effect to control synovial cell proliferation and cartilage destruction in rheumatoid arthritis, and to be put to practical use in the future rheumatoid arthritis clinic.

Key words : Rheumatoid arthritis(RA), *Eucomiae Cortex*, Herbal-Acupuncture, Collagen-induced arthritis(CIA), ST36

Ⅰ. 緖 論

關節炎은 외상이나 감염, 대사이상, 면역 및 종양 등 각종 원인에 의하여 關節 및 周圍組織에 疼痛, 腫脹, 强直, 發赤 및 運動障碍를 일으키는 질환이다[1]. 류마토이드 관절염은 직접적인 원인은 아직 규명되지 않아 發病機轉 및 병태생리에 대해 여러 방면으로 연구되고 있는 대표적인 自家免疫疾患이다.

한의학에서는 대부분의 관절질환을 人體의 正氣가 虛한 상태에서 肌肉經絡이 風寒濕 邪氣의 침범으로 氣血運行이 不暢하게 되어 발생하는 關節疾患인 痺症[2]의 범주에 귀속시키는데, 류마토이드 관절염의 증상 또한 筋骨, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 重着, 麻木 및 關節腫大, 屈伸不利, 發赤, 熱感 등의 증상을 나타내는 痺症의 범주에 속한다고 볼 수 있으며 특히 그 증상이 痺症 중 歷節風[3], 白虎風[4], 痛風[5] 등의 증상과 유사하다고 할 수 있다.

류마토이드 關節炎의 치료법에 대한 한의학적인 연구로는 鍼, 灸, 부항, 약물 및 물리치료와 단식요법 및 蜂藥鍼 등과 같은 기존의 치료법의 효과에 대한 임상연구와 실험동물모델을 이용한 澤蘭[6], 赤芍藥[7], 木防己[8] 등의 collagen유발 관절염에 대한 효과에 대한 실험연구들이 있었으나 補肝腎 强筋骨하여 腰膝疲痛, 足膝萎弱 등에 효과가 있어서 임상에서 關節疾患에 多用한 杜冲[9]에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 류마토이드 關節炎에 대한 杜冲의 치료효과를 알아보고자 TypeⅡ Collagen(CIA)으로 유발된 류마티스 關節炎 동물모델의 足三里에 杜冲藥鍼을 시술하여 關節炎 發病率과 關節炎 指標(AI), 각종 cytokine, 면역글로불린 및 Anti-collagen Ⅱ, 組織學的 變化 및 免疫細胞의 數에 미치는 影響 등을 연구하여 류마토이드 關節炎의 抑制와 免疫調節에 유의한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料

1) 動物

動物은 6~7週齡의 雌性 DBA/1J 생쥐를 Slc (*Japan*)에서 공급받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 溫度 22±2℃, 濕度 55±5%를 維持하여 2週日 間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 사용된 杜冲(*Eucomiae Cortex*; 이하 *EC*로 표기)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 使用하였다.

2. 方法

1) Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model

Collagen type II(CII)를 0.05N acetic acid 로 녹여 2㎎/㎖로 만들고, 같은 양의 Freund's complete adjuvant(FCA)로 混合하여 2㎖로 만들어, 이 溶液에 녹아 있는 CII의 濃度가 1㎎/㎖이 되도록 하였다.

DBA/1J 생쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 Normal 群, Control群, Saline群, N.P(needle prick)群, 杜冲藥鍼(EC-HA)群의 5群으로 나누고, Normal群을 제외한 각 群에 CII를 2차(0일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1㎖(CII 100㎍)의 CII를 꼬리 基底部에 接種하였다[10].

2) 取穴

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 右側 足三里(Joksamni; ST_{36})에 相應하는 部位를 取하였다.

3) 處置

Control群은 CII접종 이외의 처치는 하지 않았다.

Saline群은 CII 2차 접종 이후부터 Saline 0.2㎖를 주 3회 足三里(ST_{36})에 注入하였다.

N.P(needle prick)群은 CII 2차 접종 이후부터 주 3회 足三里(ST_{36})에 26 gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 刺入하고 즉시 제거하였다.

杜冲藥鍼(EC-HA)群은 CII 2차 접종 이후부터 右側 足三里(ST_{36})에 1%의 杜冲藥鍼液(EC-HAS) 0.2㎖를 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 實驗郡의 DBA/1J 생쥐의 다리를 관찰하여 關節炎 誘發 정도를 記錄하였다. 아래의 기준을 바탕으로 關節炎 徵候를 觀察하여 發病率(incidence; %) 및 關節炎 指標(AI)를 계산하였다[11].

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

CIA mouse 脾臟組織을 摘出하여 차게 한 D-PBS로 3회 洗滌한 후 40㎛ nylon mesh에 갈아서 脾臟細胞를 얻었다. 脾臟細胞를 5% fetal bovine serum과 antibiotics(penicillin 100U/㎖, streptomycin 100㎍/㎖)가 포함된 RPMI 1640 medium(Sigma, *USA*)을 넣어서 5×10^6 cells/㎖ 濃度로 맞추고 50㎍/㎖의 CII 또는 anti-CD3/CD28 抗體가 coating되어 있는 96 well plate에 分株하여 37℃ CO_2 培養基에서 48時間 동안 培養하였다. 培養 후 遠心分離하여 上層液만을 分離하였고 上層液 중에 分泌된 cytokines을 ELISA를 利用하여 測定하였다. Cell proliferation은 細胞培養 후 각 well에 ^{3}H-thymidine 0.25μCi를 넣어 37℃ CO_2 培養基에서 8時間동안 培養한 후 測定 하였다[12].

6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

ELISA Kit를 使用하여, 생쥐에서 分離한 serum 및 spleen cell culture supernatant에서 各 cytokine 량을 測定하였다. 抗cytokine 抗體가 코팅된 96 well plate에 serum을 加하여 反應시킨 후 4번 洗滌하고, 다시 biotin이 標式된 抗cytokine 抗體를 加하여 反應시킨 후 4번 洗滌하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 加하고 ELISA-reader를 利用하여 測定하였다.

7) Histological analysis

DBA/1J 생쥐의 다리 關節 部位를 取하여 Cryotome을 이용하여 切片한 후, hematoxylin and eosin염색(Dako Cytomation, Japan)(scheme 3)과 Masson's trichrome 염색(Dako Cytomation, Japan)(scheme 4)을 하였다.

8) Fluoresence activated cell sorter (FACS) analysis

(1) Lymph node 세포 分析

각 군에서 截取한 lymph node에서 세포를 分離하여 表式抗體를 반응시켜 Flow cytometer로 分析하였다.

(2) 관절내 세포 分析

생쥐에서 分離해 낸 다리관절을 잘게 切斷한 후 collagenase를 加하고 培養하여 分離해 낸 세포에 標式抗體를 反應시켜 Flow cytometer로 分析하였다.

9) 統計處理

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. 成 績

1. 關節炎 發病率 分析

杜冲藥鍼群에서 關節炎 發病率이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 1).

2. 關節炎 指標(AI)

關節炎 指標(AI)는 CⅡ 1차 접종을 시점으로 12주 동안 관찰하였다. 杜冲藥鍼群에서 關節炎 指標(AI)가 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 2).

3. ELISA analysis

1) IL-6 in serum

血淸內 IL-6는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 3).

2) IFN-γ in serum

血淸內 IFN-γ는 杜冲藥鍼群에서 Control群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 4).

3) TNF-α in serum

血淸 TNF-α는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

4) IgG in serum

血淸內 IgG는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 6).

5) IgM in serum

血淸內 IgM은 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 7).

6) IL-1β in serum

血淸內 IL-1β는 杜冲藥鍼群에서 Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 8).

7) Anti-collagen II in serum

血淸內 Anti-collagen Ⅱ는 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 9).

8) IFN-γ in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IFN-γ는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 10).

9) IL-4 in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IL-4는 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 11).

10) IL-10 in CIA mouse spleen cell culture

CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IL-10은 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 유의한 差異가 없었다(Fig. 12).

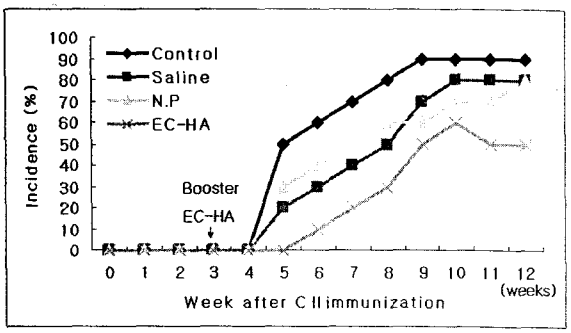

Fig. 1. Effects of EC-HA on the murine CIA incidence

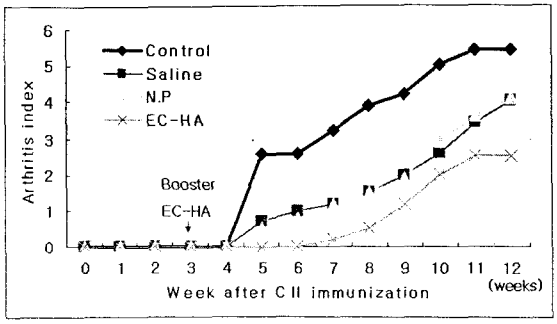

Fig. 2. Effects of EC-HA on the murine CIA arthritis index

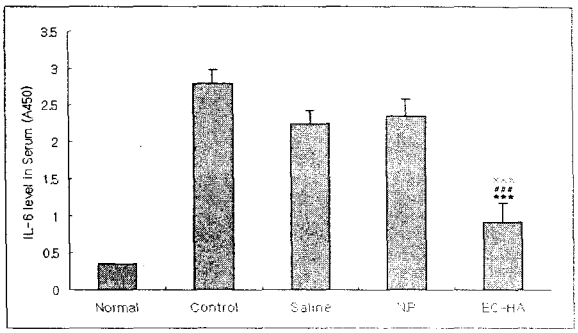

Fig. 3. The level of IL-6 in CIA mouse serum

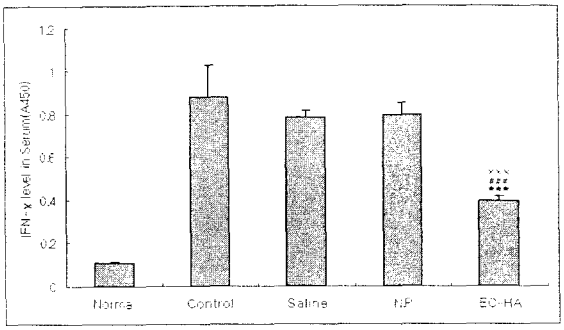

Fig. 4. The level of IFN-γ in CIA mouse serum

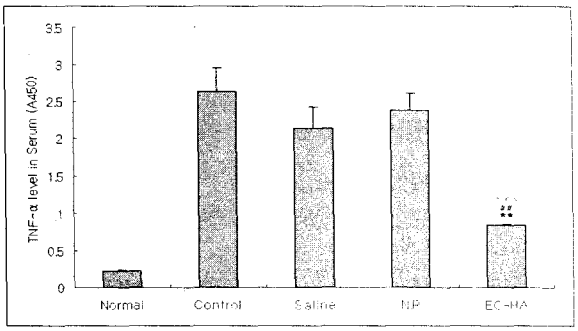

Fig. 5. The level of TNF-α in CIA mouse serum

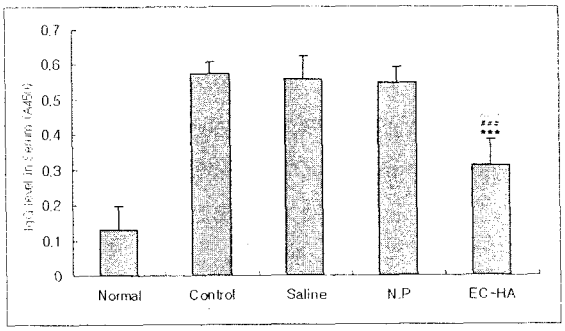

Fig. 6. The level of IgG in CIA mouse serum

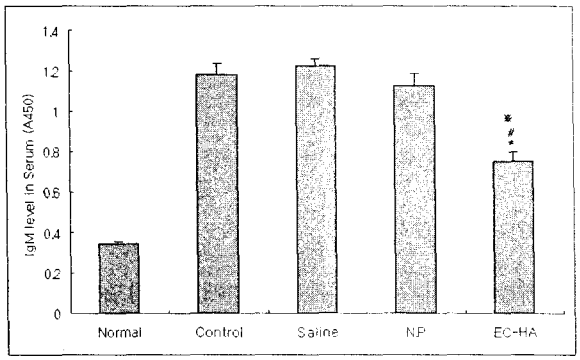

Fig. 7. The level of IgM in CIA mouse serum

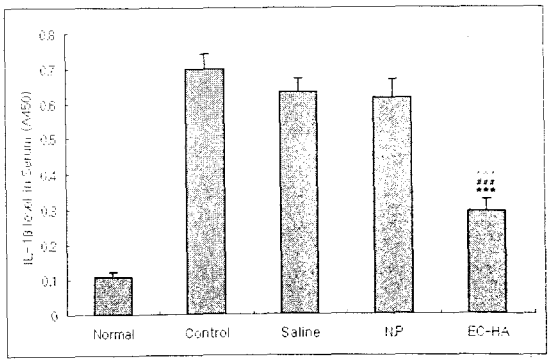

Fig. 8. The level of IL-1β in CIA mouse serum

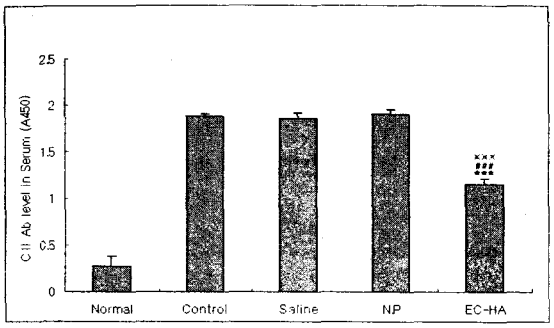

Fig. 9. The level of CII Ab in CIA mouse serum

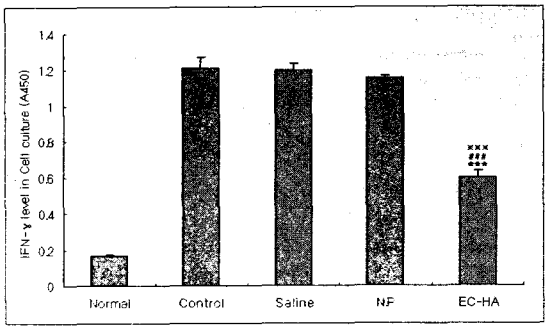

Fig. 10. The level of IFN-γ in CIA mouse spleen cell culture

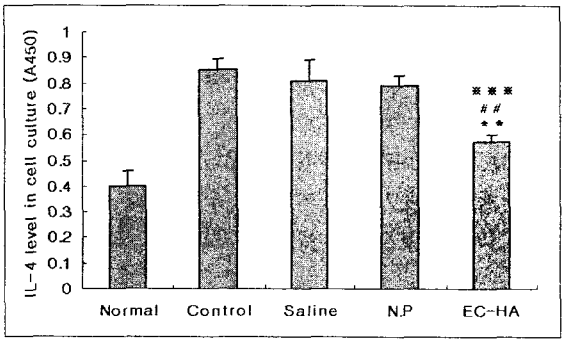

Fig. 11. The level of IL-4 in CIA mouse spleen cell culture

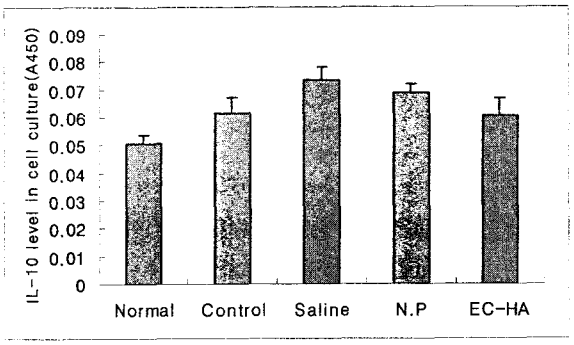

Fig. 12. The level of IL-10 in CIA mouse spleen cell culture

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

Normal spleen cell culture supernatant에서는 IL-4가 IFN-γ의 2배 가량 되었으나 Control群에서는 IFN-γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 杜冲藥鍼群에서는 IFN-γ가 현저하게 감소하여 IL-4가 IFN-γ과 비슷한 수준이 되었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다(Fig. 13).

4. Histological analysis

1) Hematoxylin and eosin stain

軟骨의 破壞와 滑膜의 增殖이 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少되었다(Fig. 14).

2) Masson's Trichrome stain

組織學的으로 collagen fiber가 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 正常에 가깝게 維持되었다(Fig. 15).

5. Fluoresence-activated cell sorter analysis

1) $CD3e^+$및 $CD19^+$ cell percentage in lymph node

淋巴節에서 T세포와 B세포의 비율을 알아보고자 $CD3e^+$세포와 $CD19^+$세포의 比率을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 16).

2) $CD4^+$및 $CD8^+$ cell percentage in lymph node

淋巴節에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보고자 $CD4^+$세포와 $CD8^+$세포의 比率을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 17).

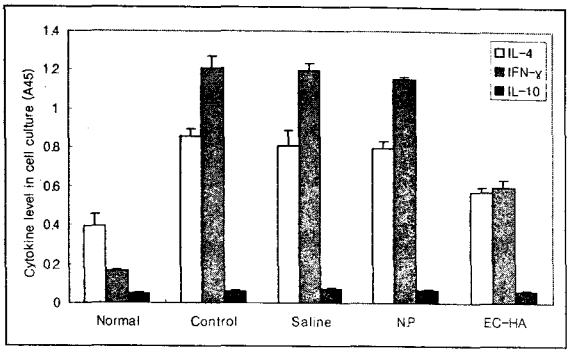

Fig. 13. IFN-γ/IL-4 and IFN-γ/IL-10 in CIA mouse spleen cell culture

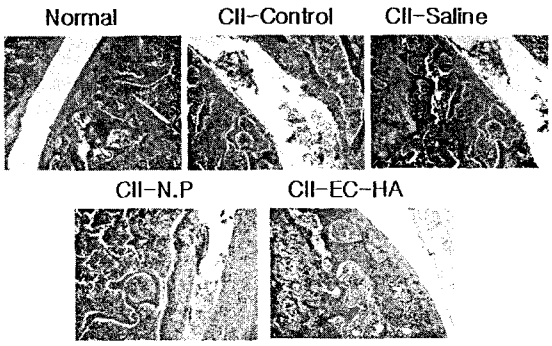

Fig. 14. Histological analysis of the sections from mouse joint

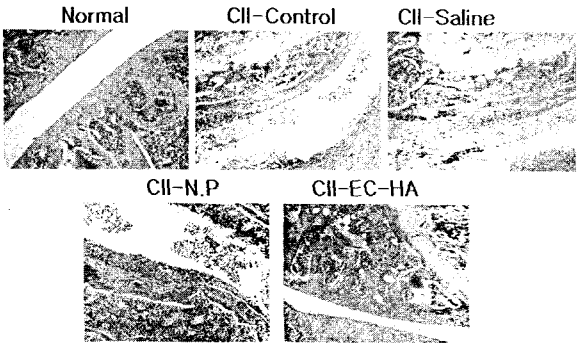

Fig. 15. Histological analysis of the mice joint sections from mouse joint

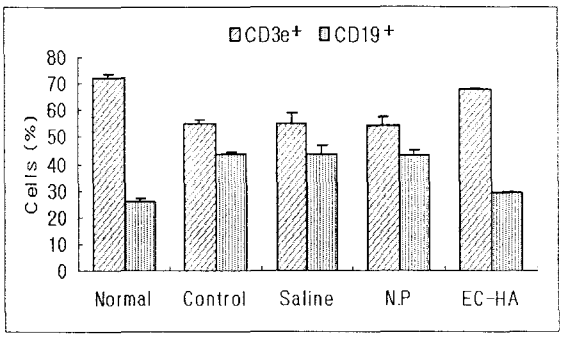

Fig. 16. Effects of EC-HA on expression of $CD3e^+/CD19^+$ in CIA mouse lymph node

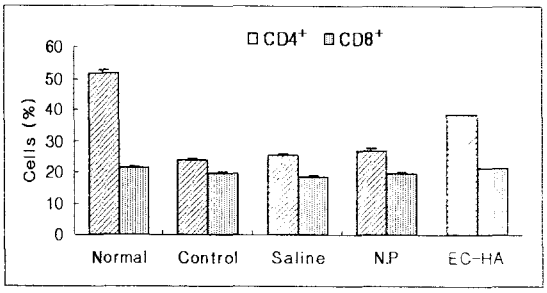

Fig. 17. Effects of EC-HA on expression of $CD4^+/CD8^+$ in CIA mouse lymph node

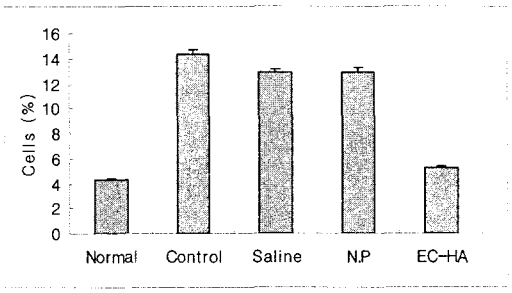

Fig. 18. Effects of EC-HA on expression of $CD3e^+/CD69^+$ in CIA mouse joint

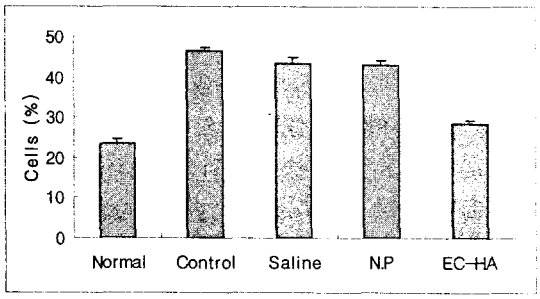

Fig. 19. Effects of EC-HA on expression of $CD11a^+/CD19^+$ in CIA mouse lymph node

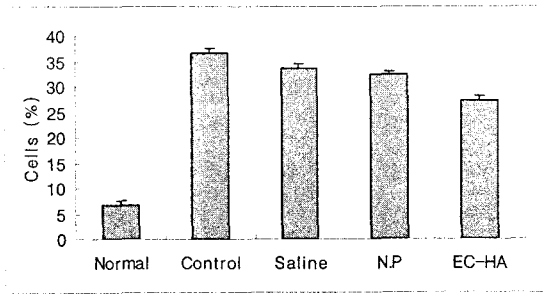

Fig. 20. Effects of EC-HA on expression of $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$ in CIA mouse joint

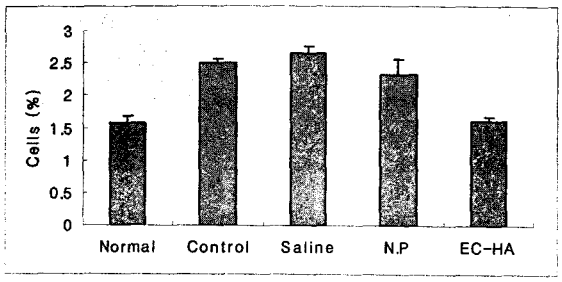

Fig. 21. Effects of EC-HA on expression of $CD4^+/CD25^+$ in CIA mouse spleen

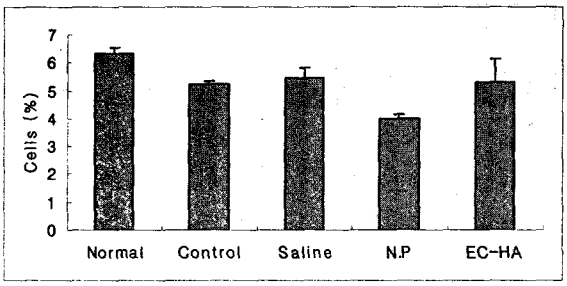

Fig. 22. Effects of EC-HA on expression of $CD4^+/CD25^+$ in CIA mouse lymph node

3) $CD3e^+/CD69^+$ cell percentage in joint

關節내 활성화된 T세포수의 변화를 알아보고자 $CD3e^+/CD69^+$세포의 비율을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 현저하게 減少하였다(Fig. 18).

4) $CD11a^+/CD19^+$ cell percentage in lymph node

淋巴節내 활성화된 B세포수의 변화를 알아보기 위하여 $CD11a^+/CD19^+$세포의 비율을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 현저하게 減少하였다(Fig. 19).

5) $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$ cell percentage in joint

關節내 염증성 과립구수의 변화를 알아보기 위하여 $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$세포의 비율을 관찰한 결과 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 20).

6) $CD4^+/CD25^+$ cell percentage in spleen

脾臟세포에서 $CD4^+/CD25^+$ 세포는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 21).

7) $CD4^+/CD25^+$ cell percentage in lymph node

淋巴節에서 $CD4^+/CD25^+$ 세포는 杜冲藥鍼群에서 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 22).

Ⅳ. 考 察

關節은 骨과 骨사이가 일정한 間隔이 있어 骨 相互間에 運動이 행하여지는 곳으로, 關節疾患은 外傷, 感染, 代謝異常, 免疫異常 및 腫瘍 등의 原因에 의하여 關節의 壓痛, 發熱, 紅斑, 滑膜滲出液, 滑膜肥厚, 關節運動의 制約 또는 摩擦音 등의 症狀을 나타내는 질환이다[13-14].

關節炎 중에서 류마토이드 關節炎은 慢性關節炎 중 退行性 關節疾患 다음으로 흔히 볼 수 있는 疾患으로, 滑液膜의 慢性的 肥大 및 炎症이 나타나서 關節軟骨과 그 周圍組織을 破壞하여 初期에는 關節의 浮腫과 疼痛을 招來하나, 進行됨에 따라 특징적인 關節變形 및 强直이 誘發되고 全身的으로 衰弱해지는 대표적인 自家免疫性 疾患이다[14-15].

류마토이드 關節炎의 직접적인 原因은 아직 糾明되어 있지 않으나 環境的인 要因과 遺傳的인 素因들이 複合的으로 作用하여 關節炎을 일으키는 것으로 推定되고 있다. 이러한 原因에 의해서 免疫 調節機轉에 異常이 招來되고 慢性炎症이 특히 關節을 중심으로 지속되는데, 염증에 관련된 세포 즉 림프구, 대식세포, 섬유화세포 등에서 분해된 각종 cytokine과 단백분해효소를 비롯한 다양한 炎症誘發因子에 의해서 지속적인 組織損傷이 일어난다고 認定되고 있다[14]. 최근에는 細胞水準과 分子生物學的 側面에서 深層研究가 進行되면서 류마토이드 關節炎의 滑液膜 細

胞層에 無秩序하게 過度 增殖하고 pannus가 形成되어 周邊 軟骨 및 骨破壞로 移行되는 惡性 腫瘍의 樣相을 나타내고 있어 많은 注目을 받고 있다. 滑液膜의 p53 腫瘍 抑制 遺傳子 變異나 TNF-α와 결합하는 受用體 TNFR1, TNFR2가 滑液膜 細胞內로의 信號傳達에 가담하여 滑液膜 細胞의 apoptosis 不均衡을 초래하는 非免疫學的 因子의 糾明에 다각적인 시도가 있었지만 그 동안 류마토이드 關節炎에 대한 파악은 주로 免疫學的 機轉을 核心으로 이루어졌다고 할 수 있다[16-17].

足三里(ST_{36})는 免疫機能을 强化시킬 수 있는 經穴[18] 중 하나로 足陽明胃經에 屬하고 胃經의 合穴로 六腑下合穴이며 回陽九針穴, 四總穴, 中風七處穴 中의 하나이며, 調氣血, 理脾胃, 補虛弱하는 效能이 있어 膝關節痛, 消化器系疾患, 乳痛, 虛弱體質, 貧血, 皮膚瘙痒症, 알레르기성 疾患, 臟氣虛憊, 眞氣不足等의 疾患에 廣範圍하게 應用되고 있다[19-20].

藥鍼療法은 穴位注射療法이라고 하며, 一種의 東西의 結合形態인 新鍼法으로 患者의 疾病을 根據로 穴位의 經絡作用과 藥物의 藥理作用을 살핀 다음, 相應하는 兪穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하게 하여 疾病을 治療하는 方法으로 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 의하여 穴位 혹은 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併合된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎭痛, 腫瘍誘發抑制등의 治療效果가 있는 것으로, 藥物의 吸收가 빠르고, 經口投與가 不可能한 境遇에 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있다[19,21-22].

杜冲은 杜冲科(Eucommiaceae)에 속하는 落葉喬木인 杜冲 *Eucommia ulmoides* Oliv.의 樹皮를 乾燥한 것으로[23] 처음 ≪神農本草經·上品≫[24]에 "味辛甘 主腰脊痛 補中益精氣 堅筋骨 强志 除陰下痒濕 小便餘瀝 久服輕身耐老 一名思仙 生山谷"이라고 記載된 이래 補肝腎 强筋骨 安胎 降血壓의 효능을 지니고 있어 腎虛로 인한 腰膝酸痛, 足膝痿弱, 小便餘瀝, 陰下濕痒, 高血壓 등에 많이 이용되며 免疫機能을 향상시키는 작용도 보고되었다[25].

이에 著者는 Collagen-induced arthritis(CIA) mouse의 足三里(ST_{36})에 杜冲藥鍼을 施術한 후 류마토이드 關節炎에 관련된 각종 cytokine, 면역 글로불린 및 면역세포를 分析하여, 류마토이드 關節炎에 대한 杜冲藥鍼의 效果를 實驗的으로 觀察하였다.

實驗 시작 4주후부터 關節炎이 發病하기 시작하여 12주까지 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 그리고 N.P群에 비하여 낮은 發病率을 보였으며(Fig. 1), 關節炎 指標(AI)또한 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 2).

류마토이드 關節炎의 발생에 있어 세포성 免疫反應은 주로 T림프구에 의하여 이루어지나, NK세포와 대식세포들에 의해 이루어지기도 하며, 이들 세포간에는 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다[26-27].

急性炎症이 주로 血管變化, 浮腫 및 호중구의 浸潤을 동반하는 반면에 慢性炎症은 특징적으로 대식세포, 림프구 및 형질세포의 浸潤, 섬유모세포와 소혈관의 증식, 纖維化 및 組織의 破壞 등의 소견이 나타나는데[28] 대표적 慢性炎症性 질환인 류마토이드 關節炎에서도 滑液膜에 활액세포가 增殖하고 많은 림프구와 어느 정도의 형질세포 그리고 대식세포가 浸潤된다[14].

Th림프구 중 Th1세포는 IL-2, IFN-γ, lymphotoxin을 生産하고 Th2세포는 IL-4, IL-5. IL-6 및 IL-10을 生産하며 IL-3, TNF-α 및 GM-CSF는 Th1 및 Th2 모두에서 生産되는 것으로 알려져 있다. Th림프구는 IL-2, IL-6, TNF-α 등의 cytokine을 分泌하여 대식세포의 활성화와 HLA molecule을 增加시키며 그 외에 B세포의 增殖과 分化에 관여하며 국소적으로 B세포의 刺戟을 增進시킨다. 이들의 機能的 차이를 硏究한 결과 Th2세포에서 分泌되는 IL-4는 IgE의 生成을 增加시키고 Th1에서 分泌되는 IL-2 및 IFN-γ는 IgE의 生成을 抑制하는 반면에 Th2세포가 生成한 IL-10이 Th1세포의 cytokine 生成들을 抑制하며, IFN-γ는 Th2세포의 cytokine 生成을 抑制한다는 사실로 보아 이들은 서로 다른 cytokine 生成을 통하여 相互抑制 作用을 함으로써 免疫調節에 關與하는 것으로 생각된다[27,29].

단핵구는 血管밖으로 나가 대식세포로 바뀌며 T림프구에서 分泌되는 IFN-γ와 같은 cytokine에 의해 活性化되어 IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophagemgrowth factor β, transforming growth factorβ 등의 cytokine과 prostanglandin E2와 collagenase를 分泌한다. 이 중 IL-1β, IL-6, TNF-α는 가장 많이 분포하는 대표적인 炎症誘發 cytokine이다[29].

B림프구는 활성 T세포에 의하여 본격적으로 세포분열과 형질세포로 分化하여 IgG항체를 生産하고, 이 IgG가 다시 항원으로 作用하여 IgG의 항체인 RF를 生産한다. RF는 활액막에서 IgG와 응집물을 形成하면 보체를 활성화시키는 화학 매개물이 放出

되고 활액세포 및 호중구는 lysosome 효소를 放出하여 활액세포 破壞와 炎症反應을 일으킨다[29].

IL-6는 IL-1과 TNF-α 에 의해 分泌가 促進되는 급성 조절 단백질로서 류마토이드 關節炎의 炎症反應에 주된 媒介 作用으로 혈청 및 關節炎의 손상된 關節의 關節液에서 活性度가 增加하며, 骨關節炎보다 높은 活性度를 보여 류마토이드 關節炎의 活性度와 聯關性이 있다. 또한 Katherine[30] 등은 IL-6이 활액막이나 關節組織의 血管에서 分泌되어 혈청에서보다 關節液에서 더 높은 活性度를 보인다고 한 것으로 보아서 IL-6가 류마토이드 關節炎에서 免疫反應의 媒介體로서 病理生理에 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다[31].

IFN-γ는 대식세포 활성화 cytokine이며 先天免疫과 細胞媒介 特異免疫에서 중요한 役割을 한다. IFN-γ는 Th1아집단의 특징 cytokine으로서 항바이러스성 活性을 가지는 제1형 IFN(IFN-α, IFN-β)과 구분하여 제2형 IFN이라고도 불린다. IFN-γ는 NK세포, Th1 및 Tc 세포에 의해서 生成되는 당단백질이며 Th1아집단의 표지 cytokine이다. NK세포는 미지의 미생물 成分의 認識反應에서 또는 IL-12에 대한 反應에서 IFN-γ를 分泌하는데 이때의 IFN-γ는 先天免疫의 媒介者로서 機能을 한다. IFN-γ의 受用體는 두 개의 構造的으로 相同인 폴리펩티드로 構成되는데 하나는 cytokine에 結合하고 다른 하나는 信號傳達에 參與한다. IFN-γ는 T세포와 NK세포가 대식세포를 活性化하여 飽食된 미생물을 죽이도록 하는 방법을 提供하는 대식세포 活性化 cytokine이다. IFN-γ는 APCs(antigen presenting cells)표면에 class I과 classII MHC분자와 동시자극자(costimulator)의 發現을 刺戟한다. IFN-γ는 또한 항원처리에 연관된 운반자(TAP), 프로테아좀(proteasome)의 構成要素 및 항원처리 과정에 隨伴되는 많은 단백질의 合成을 刺戟한다. 그래서 IFN-γ는 MHC결합 항원제시를 增進시키고 T세포가 認識하는 배위자(ligand)의 增加된 發現에 의해 免疫反應의 認識段階를 增幅시킨다[31].

TNF-α(Tumor Necrosis Factor-α)는 단핵세포, 림프구, 섬유세포 등 여러 종류의 세포에서 發現되는데, 활막세포 增殖의 가장 중요한 cytokine으로 炎症反應을 促進하고, 류마토이드 關節의 활막세포에서 collagenase나 PGE_2의 合成을 誘導하여 組織을 破壞하는데 결정적인 機能을 한다[27,32].

IL-1은 단핵구, 대식세포, B세포, 活性化된 T세포에서 生成되고, IL-1α, IL-1β의 두 가지 형태가 있으며[29] IL-1β는 류마토이드 關節炎에서 T세포와 B세포의 機能을 增進시키고 호중구, 림프구, 단핵세포의 浸潤을 誘發하며, ICAM-1의 發現을 促進하여 내피세포에 대한 백혈구의 癒着性을 增加시키고, 섬유모세포, 활액막세포 및 연골세포에서 PGE2와 collagenase 生産을 促進하여 관절연골의 破壞와 骨의 再吸收를 招來한다[33-35].

본 實驗에서 CIA mouse의 血淸 IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-1β는 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 그리고 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 3, 4, 5, 8). 따라서 足三里 杜冲藥鍼이 Collagen 투여에 의한 炎症을 억제하였음을 알 수 있었다.

류마토이드 關節炎 患者의 B림프구는 혈청이나 關節내에서 自家抗體인 IgG, IgM, IgA를 分泌하며 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로불린의 Fc부위에 대한 自家抗體인 류마토이드 因子(rheumatoid factor, RF)를 生成한다. 일단 IgG와 RF가 항원-항체 複合物을 形成하면 보체를 活性化 시키는 化學媒介物이 放出되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 放出하여 활막세포 破壞와 炎症反應을 일으킨다[36-37]. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체내에서 류마토이드 關節炎의 活動性과 有關한 指標가 되며, 이 중 IgM-RF는 류마토이드 關節炎患者의 ⅔에서 陽性으로 나타나며, 測定이 容易하여 臨床에서 주로 利用된다[38].

본 실험에서 CIA mouse의 血淸 IgG와 IgM 모두 杜冲藥鍼群에서 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하여(Fig. 6, 7), 足三里 杜冲藥鍼에 의하여 免疫反應이 抑制 調節되었음을 알 수 있었다.

關節炎 發生初期에는 B림프구가 관계하는 體液性 免疫反應이 보다 중요한 役割을 하는데, B림프구의 表面에서 放出되는 IgG anti-collagen 항체는 제 II형 collagen에 대한 特異反應을 보인다. 이 항체가 增加하는 경우 關節炎이 發生하며, 일반적으로 항체 정도와 關節炎의 심한 정도는 관련이 있어 이를 측정하여 關節炎의 객관적 지표로 이용하고 있는데, 血淸內 Anti-collagen II를 관찰한 결과 杜冲藥鍼群이 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 9).

IL-4, IL-10 및 IL-13은 류마토이드 關節炎 患者에서 IL-1β와 TNF-α, IL-6, IL-8의 轉寫를 抑制하여 過剩 生産을 차단하는데, 특히 IL-10은 IL-1β와 TNF-α의 水準을 抑制하는데 가장 效果的이다. IL-4는 炎症誘發 cytokine의 mRNA를 減少시키며, IL-4

와 IL-13은 IL-1 抑制劑인 IL-1Ra의 分泌를 강하게 增加시킨다.

CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IFN-γ와 IL-4는 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였으나(Fig. 10), IL-10은 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 유의한 差異가 없었다(Fig. 12). IFN-γ/IL-4, IFN-γ/IL-10의 비율을 살펴보면 Normal spleen cell culture supernatant에서는 IL-4가 IFN-γ의 2배 가량 되었으나 Control群에서는 IFN-γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 杜冲藥鍼群에서는 IFN-γ가 현저하게 감소하여 IL-4가 IFN-γ과 비슷한 수준이 되었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다 (Fig. 13). 따라서 足三里 杜冲藥鍼이 免疫反應 調節에 유의한 작용을 하였음을 알 수 있었다.

Hematoxylin and eosin stain은 組織의 構造를 觀察하기 위한 染色法으로, 이를 이용하여 關節의 組織을 觀察한 결과, 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 軟骨의 破壞와 滑膜의 增殖이 減少하였음을 알 수 있었다(Fig. 14).

Masson's Trichrome stain은 collagen fiber를 觀察하기 위한 染色으로, 組織學的으로 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 collagen fiber가 正常에 가깝게 維持됨이 觀察되었다(Fig. 15).

免疫細胞는 세포의 種類나 分化 段階에 따라서 特徵的인 表面分子(cluster of differentiation, CD)를 表現한다. 이들 表面分子에 結合하는 個別的인 항체에 螢光物質을 附着시킨 후에 이 螢光物質의 量을 測定함으로써 특정 免疫細胞의 生成量을 測定할 수 있다. 實驗에서 測定된 CD의 減少는 免疫反應에 關與하는 免疫細胞의 減少를 意味한다. 免疫細胞는 혈관과 림프관에서 일정 濃度를 維持하고 있는데, 특정 物質에 의한 特定 免疫細胞의 感作은 이에 해당하는 多量의 免疫細胞를 生産하도록 한다. 骨髓(bone marrow)에서부터 말초 림프기관까지의 過程에서 免疫細胞의 生成을 抑制하는 多樣한 經路가 存在한다[31].

免疫初期에 T세포는 CD9, CD10 등을 가지고 있으나, 세포가 成熟하면서 CD4, CD3, CD8 등을 얻게 되며, 成熟된 흉선세포는 두 개의 종류로 분리되는데, CD4와 CD8이다. CD4+ T세포는 보조 T세포이고, CD8+ T세포는 억제 T세포 또는 세포독성 T세포로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 細分하는 表式因子로 이용되고 있으나 모든 T세포 表面에 表現되는 表式因子로 CD3+가 있으며 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다[27].

CD3e세포는 T세포 항원 수용체와 밀접하게 聯關되어 있으며 抗原認識 信號를 세포 안으로 전달하는 機能을 하고, CD19세포는 B세포의 수를 測定하는데 주로 사용하며, 항체를 직접 生産하여 外部物質을 中和시키는 體液性 免疫反應에 關與한다[39].

CD69는 休止期 림프구에서는 發現되지 않지만, T세포가 活性化되면 2시간 이내에 發現이 되어 初期 活性因子로 불리는 細胞表面 蛋白質이며, 活性化된 T세포 및 B세포, 대식세포, NK세포에서도 發現이 된다. T세포와 내피세포 간의 相互作用에 있어서 T세포를 活性化시키는데 CD69같은 多樣한 表面表示因子들의 發現이 增加된다[40].

CD11a는 白血球에서 發現되고, CD18과 짝을 이루며 附着과 세포의 移動作用을 한다[40].

CD11b는 단핵세포, 과립구, NK 세포에서 發現되는 細胞表面分子로서, 이 세포들은 炎症時에 제일 먼저 도착하는 血球들로 身體에 浸透한 抗原에 대한 貪食作用이 기본 기능이다. 또한 류마토이드 關節炎 患者의 滑膜組織에서는 炎症反應으로 인하여 CD11b의 發現이 增加되어 있다고 報告되고 있다.

Gr-1의 강한 陽性反應을 보이는 세포들은 顆粒白血球들이다[32].

CD4는 보조 T세포(Th세포)에, CD25는 활성화된 T세포, 대식세포, B세포에 發現한다[27].

淋巴節에서 T세포와 B세포의 비율을 알아보고자 $CD3e^+$세포와 $CD19^+$세포의 比率을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 16).

淋巴節에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보고자 $CD4^+$세포와 $CD8^+$세포의 比率을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 17).

關節내 활성화된 T세포수의 變化를 알아보고자 $CD3e^+/CD69^+$세포의 비율을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 현저하게 減少하였다(Fig. 18).

淋巴節내 활성화된 B세포수의 變化를 알아보기 위하여 $CD11a^+/CD19^+$세포의 비율을 관찰한 결과, 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 顯著하게 減少하였다(Fig. 19).

關節내 炎症性 顆粒救數의 변화를 알아보기 위하여 $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$세포의 비율을 관찰한 결과 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 20).

免疫調節細胞인 regulatory T세포를 알아보기 위하여 $CD4^+/CD25^+$ 세포의 비율을 관찰한 결과 脾臟세포에서 杜冲藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였고(Fig. 2-21), 淋巴節에도 杜冲藥鍼群이 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 22).

本 實驗에서 Saline群 및 N.P群에서도 Control群에 비해 대부분 감소되는 경향을 보였으나 유의성이 없었는데 이는 류마토이드 關節炎에 대한 足三里 杜冲藥鍼의 효과가 經穴刺戟의 효과보다는 주로 杜冲藥針液의 작용이었음을 알 수 있었다.

以上의 實驗結果를 綜合하면 杜冲藥鍼은 류마토이드 關節炎에서 免疫反應을 調節하여 염증을 억제시키는 作用이 있어 류마토이드 關節炎 抑制 및 治療에 有效한 것으로 판단되며 向後 이에 대한 持續的 硏究와 臨床的 應用이 필요하다고 思料된다.

V. 結 論

DBA/1J mouse를 대상으로 杜冲藥鍼이 Collagen-induced arthritis에 미치는 影響을 알아보기 위하여 關節炎 發病率과 關節炎 指標(AI), 각종 cytokine, 면역글로불린 및 Anti-collagen II, 組織學的 變化 및 免疫細胞의 數에 미치는 影響 등을 觀察한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 關節炎 發病率과 關節炎 指標(AI)

1) 杜冲藥鍼群에서 關節炎 發病率이 현저하게 낮았다.
2) 杜冲藥鍼群에서 關節炎 指標(AI)가 Control群에 비하여 낮았다.

2. 杜冲藥鍼이 각종 cytokine, 면역 글로불린 및 Anti-collagen II에 미치는 影響

1) 血淸내 IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-1β는 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였다.
2) 血淸내 IgG, IgM은 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였다.
3) Anti-collagen II는 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였다.
4) 脾臟細胞培養에서 IFN-γ, IL-4, IFN-γ/IL-4의 비율은 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 有意性있게 減少하였으며 IL-10은 유의한 차이가 없었다.

3. 杜冲藥鍼이 關節의 組織學的 變化에 미치는 影響

1) Hematoxylin and eosin stain에서 杜冲藥鍼群이 軟骨의 破壞와 滑膜의 增殖이 減少되고 正常群에 類似한 構造로 回復되었다.
2) Masson's Trichrome stain에서 杜冲藥鍼群의 교원질섬유가 正常群과 같이 維持되었다.

4. 杜冲藥鍼이 免疫細胞의 數에 미치는 影響

1) 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 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 正常群과 類似한 比率이 維持되었다.
2) 關節內 $CD69^+/CD3e^+$ 細胞와 淋巴節內 $CD11a^+/CD19^+$ 細胞, $CD11b^+/Gr\text{-}1^+$ 細胞는 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 減少하였다.
3) 脾臟細胞에서 $CD4^+/CD25^+$ 細胞는 杜冲藥鍼群에서 Control群에 비하여 減少하였고 淋巴節에서 $CD4^+/CD25^+$ 細胞는 正常群과 類似한 비율을 유지하였다.

以上의 結果로 足三里 杜冲藥鍼은 Collagen-induced arthritis에 有效한 것으로 나타났으며 류마토이드 關節炎 치료에 있어 向後 持續的인 硏究와 臨床的 應用이 필요하리라 思料된다.

Ⅵ. 參考文獻

1. 김전, 정승준. 통증의 병태생리. 대한신경과학회지. 2002 ; 20(1) : 1-7.
2. 권재상. 痺症. 서울 : 정담. 1993 ; 207-70.
3. 張仲景. 金匱要略方論. 臺灣 : 東方書店. 1950 ; 30-9.
4. 裵元植. 最新韓方臨床學. 서울 : 南山堂. 1989 ; 446.
5. 金起瑩. 類風濕性關節炎의 病因·病機 및 治法에 대한 文獻的 考察. 한방재활의학회지. 1998 ; 8(2) : 223.
6. 이준호. 택란약침이 collagen으로 유발시킨 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 287-318.
7. 성은미. 적작약약침이 관절염에 미치는 실험적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 221-50.
8. 이연경. 목방기약침이 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(4) : 125-42.
9. 강소신의학원편 김창민 외 역. 中藥大辭典. 서울 : 정담출판사. 1998 ; 1450-5.
10. 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.
11. 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.
12. Pongchairerk U, Guan JL, Leardkamolkarn V. Focal adhesion kinase and Src phosphorylations in HGF-induced proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line, HuCCA-1. World J Gastroenterol. 2005 ; 11(37) : 5845-52.
13. 李文鎬外. 內科學(下). 서울 : 學林社. 1994 ; 1693-702.
14. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 ; 109-31, 175-89.
15. 吉利和 編著. 內科診斷學. 서울 : 제일의학사. 1994 ; 176, 668-9.
16. 한창환, 김형관, 김원유, 이광원, 엄의용, 김정만. 류마토이드 관절염 활액막에서의 p53종양억제 유전자 변이. 대한정형외과학회지. 2001 ; 36(1) : 9-15.
17. Pelman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines GK 3rd, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediate apoptosis. Arthritis Rheum. 2001 ; 44(1) : 21-30.
18. 서범석. 免疫과 관련된 腧穴 考察. 대전대 논문집. 1994 ; 2(2) : 133-61.
19. 全國韓醫科大學鍼灸經穴學敎室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1988 ; 21, 389, 1457, 4-217, 489-90, 730-2, 1408-9.
20. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 ; 83-4, 404-5.
21. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용(2). 대한약침학회. 1997 ; 1-5.
22. 대한약침학회. 약침요법 시술지침서. 대한약침학회. 1999 ; 13-9.
23. 全國韓醫科大學 本草學敎授 共編著. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 ; .556-7.
24. 孫星衍, 孫馮翼 輯. 神農本草經. 北京 : 人民衛生出版社. 1993 ; 43.
25. 강소신의학원편 김창민 외 역. 中藥大辭典. 서울 : 정담출판사. 1998 ; 1450-5.
26. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학 강의. 대구 : 경북대학교출판부. 1996 ; 193-235.
27. 김세종. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 ; 18, 134, 148-50.
28. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1997 ; 1166-70.
29. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울 : 도서출판정담. 1997 ; 1179-85.
30. Katherine L, Manson Terry L, Moore James M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with Juvennile Rheumatoid Arthritis, J. Rheumatol. 1994 ; 21 : 2359-63.

31. 강재성 외. 세포분자면역학 5판. 서울 : 범문사. 2004 ; 243-53, 261-9, 423.
32. Thirumalai Ramalingam et al. Kinetics of Cellular Responses to Intraperironeal Brugia pahangi Infecrions in Normal and Immunodeficient Mice. Infection And Immunity. 2003 ; 4361-7.
33. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 1997 ; 63, 118, 120-8, 175-87.
34. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1997 ; 100, 114, 117, 122-31, 179, 180, 253, 255, 262, 266-9.
35. 서울대학교 의과대학편. 종양학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1992 ; 188, 189, 228, 229.
36. 김세윤. 류마티스 진료. 서울 : 군자출판사. 2001 ; 219.
37. Wang H. et al. Regulation of autoreactive anti-IgG(rhematoid factor) B cells in normal and autoimmune mice. Immunol Res. 1999 ; 19(2-3) : 259-70.
38. 이규범. 임상병리 핸드북. 서울 : 고문사. 1995 ; 233-5.
39. Bruce albert et al. Molecular biology of the cell(3rd edition). New york : Garland Publishing. 1994 ; 1195-7.
40. Robert R. Rich et al. Clinical immunology. New York : Mosby. 2001 ; 4 : 13, 6 : 18.