

원저

足三里 獨活藥鍼이 Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향

양기영 · 김영일 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with *Angelicae Pubescentis Radix* Solution at *Joksamni*(ST₃₆) on Collagen-induced Arthritis

Yang Gi-young, Kim Young-il and Lee Hyeon

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

Objective & Methods : The purpose of this study is to observe the effects of *Angelicae Pubescentis Radix* herbal-acupuncture solution(APR-HAS) at Joksamni(ST36) on collagen II induced arthritis in DBA/1J mice. The author performed several experimental items to analyze several cytokines and immune cells related with RA.

Results : 1. In the APR-HA group, the incidence of arthritis and arthritis index were significantly decreased.

2. In APR-HA group, the levels of IL-6, INF- γ , TNF- α , IgG, IgM, IL-1 β and Anti-collagen II in serum of the CIA mouse were significantly decreased.

3. In APR-HA group, the level of IFN- γ , IL-4 in the CIA mouse spleen cell culture were significantly decreased.

4. In histology, the cartilage destruction and synovial cell proliferation were decreased in the APR-HA group, and the collagen fiber expressions in the APR-HA group were similar with that of the Normal group.

5. In the APR-HA group, CD3e+/CD19+ and CD4+/CD8+ were similarly maintained as Normal group in the CIA mouse lymph nodes,

· 접수 : 2006년 5월 11일 · 수정 : 2006년 5월 20일 · 채택 : 2006년 5월 20일
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 구성동 476-8 대전대학교 천안한방병원 침구과
Tel. 041-560-8783 E-mail : lh2000@hanmir.com

- 6. In the APR-HA group, CD3e+/CD69+ was significantly decreased in the CIA mouse joint.
- 7. In the APR-HA group, CD11a+/CD19+ and CD11b+/Gr-1+ were significantly decreased in the CIA mouse lymph nodes
- 8. In the APR-HA group, CD4+/CD25+ was decreased in the CIA mouse spleen cell.
- 9. In the APR-HA group, CD4+/CD25+ was similarly maintained as Normal group in the CIA mouse lymph nodes.

Key words : *Angelicae Pubescentis Radix*, Herbal-Acupuncture, ST36, Collagen-induced arthritis(CIA)

I. 緒 論

인체 각 부위에서 일어나는 굴신과 회전운동을 촉진시키고 과도한 자극을 분산시키는 운동기관인 관절¹⁾에 외상, 감염, 대사이상, 면역이상 및 종양에 의하여 관절부위에 발생하는 염증질환을 관절염이라 한다²⁾. 그 중에서 류마티드 관절염은 퇴행성관절염 다음으로 흔히 볼 수 있는 만성 전신 염증질환²⁾으로, 확실한 원인이 알려져 있지는 않지만, 최근에는 환경적인 요인과 유전적 소인들이 작용하여 면역 조절 기전에 이상을 초래하여 발생하는 자가면역성 질환의 일종인 것²⁾으로 인정되고 있다.

한의학에서는 관절염을 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺, 風痺, 痺症 등으로 해석하고 있으며, 크게는 痺證의 범주에 포함시키고 있다³⁾. 痺證은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調, 腠理空疎, 혹은 正氣虛弱한 틈을 타고 肌表, 經絡을 침입하거나 관절에 응체됨으로써 기혈운행이 순조롭지 못하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利하고 심하면 관절의 강직성 변형을 초래하게 되는 것을 말하며, 치료는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 방법으로 鍼, 艾灸, 약물, 약침요법 등을 활용하고 있다^{3,4)}.

관절염에 대하여 약침⁵⁾을 이용한 한의학적 실험 연구가 활발히 이루어지고 있는데, adjuvant, collagen 등 면역반응을 일으키는 항원 또는 T세포의 활성화유발제를 통한 혈액학적, 혈청학적, 조직학적 소견에 국한되었던 과거의 연구와는 달리 최근의 연구는 면역세포의 표식분자, 개별항체의 탐색, 조직별 염증성 cytokine의 농도 등에 검색에 분자생물학적인 방법을 응용하는 방향으로 전환하고 있다⁶⁾. 지금까지는

秦艽, 草烏, 紅花 등의 약침이 adjuvant 관절염에, 澤蘭, 赤芍藥, 木防己, 細辛, 羌活, 五加皮 등의 약침이 collagen 유발 관절염에 유의성이 있다는 연구가 있었으나⁶⁾, 祛風除濕, 解表止痛의 효능이 있어 風寒濕邪가 肌肉과 관절에 重着하여 나타나는 통증과 하지의 痺症에 많이 쓰이는 獨活(*Angelicae Pubescentis Radix*)⁷⁾에 대한 약침연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 collagen type II(CII)로 관절염을 유발시킨 생쥐의 足三里(ST₃₆)⁸⁾에 독활약침을 시술한 후, 관절염 발병률 및 지표 분석, 효소연관면역분석법(ELISA)에 의한 비장세포 배양 상층액과 혈청의 cytokine 측정, 유세포분석기(flow cytometer)를 이용한 림프절과 관절의 형광활성세포분석 등의 실험을 통하여 항염증 효과에 대한 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

동물은 6~7주령의 암컷 DBA/1J 생쥐를 Slc (Japan)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

실험에 사용된 獨活(*Angelicae Pubescentis Radix*; 이하 APR로 표기)은 대전대학교 부속 한방병원에

서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 藥鍼液의 製造

분쇄기를 이용해서 독활 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 원형 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 이 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 이 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH6.8이 되도록 조절하고, 저온에서 12시간 방치한 후 멸균하였다. 멸균된 농축액에 인산완충생리식염수(PBS)를 가하여 1%로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

2. 방법

1) *in vitro*

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정방법은 SRB assay법에 준하여 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°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하고 30분간 배양한 후 PBS로 2회 1,500rpm에서 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°C 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 독활약침액(0.1%, 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°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 각 well당 100 µl씩 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 Normal 군, Control군, Saline군, N.P(needle prick)군, APR-HA(독활약침)군의 5군으로 나누고, Normal군을 제외한 각 군에 CII를 2차(0일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1ml(CII 100µg)의 CII를 꼬리 기저부에 접종하였다.

(2) 取穴

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 우측 足三里(ST₃₆)에 상응하는 부위를 취혈하였다.

(3) 處置

Control군은 CII 접종 이외의 처치는 하지 않았다. Saline군은 CII 2차 접종 이후부터 Saline 0.2 ml를 주 3회 족삼리에 주입하였다. N.P(needle prick)군은 CII 2차 접종 이후부터 주 3회 족삼리에 26G 주사침을 0.5cm 정도 깊이로 자입한 후 바

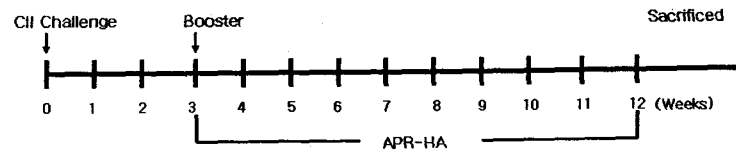


Fig. 1. Treatment of collagen-induced arthritis(CII) mouse model

로 제거하는 자극을 하였다. APR-HA(독활약침)군은 CII 2차 접종 이후부터 죽삼리에 1%의 APR-HAS(독활약침액) 0.2ml를 주 3회 주입하였다(Fig. 1).

(4) 관절염 발병률 및 지표(AI) 분석

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

$$\text{Incidence(\%)} = (\text{각 단계의 관절염이 유발된 동물 수} / \text{전체 동물 수}) \times 100$$

$$\text{Arthritis Index} = \frac{\text{유발된 동물의 단계별 관절염 지수의 합}}{\text{전체 동물 수}}$$

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

비장조직을 적출하여 차게 한 D-PBS로 3회 세척한 후 40 μ m nylon mesh에 갈아서 비장세포를 얻었다. 비장세포를 5% fetal bovine serum과 antibiotics(penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml)가 포함된 RPMI 1640 medium (Sigma, USA) 넣어서 5 \times 10⁶ cells/ml 농도로 맞추고 50 μ g/ml CII 또는 anti-CD3/CD28 항체가 coating되어 있는 96 well plate에 분주하여 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 상층액을 분리하였고 상층액 중에 분비된 cytokines을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. Cell proliferation은 세포 배양 후 각 well 에 ³H-thymidine 0.25 μ Ci 넣어 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 8시간동안 배양한 후 측정 하

였다.

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

ELISA Kit를 사용하여, 생쥐에서 분리한 serum 및 spleen cell culture supernatant에서 각 cytokine 량을 측정하였다. 항cytokine 항체가 코팅된 96 well plate에 serum을 가하여 반응시킨 후 4번 세척하고, 다시 biotin이 표식된 항cytokine 항체를 가하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 가하고 ELISA-reader를 이용하여 측정하였다.

(7) Histological analysis

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

(8) Fluorescence activated cell sorter(FACS) analysis

① Lymph node 세포 분석

각 군에서 절취한 lymph node에서 세포를 분리하여 표식항체를 반응시켜 유세포분석기(flow cytometer)로 분석하였다.

② 관절내 세포 분석

생쥐에서 분리해 낸 다리관절을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하고 배양하여 분리해 낸 세포에 표식항체를 반응시켜 유세포분석기로 분석하였다.

(9) 통계처리

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

III. 結果

1. *in vitro*

1) 세포독성 측정

세포의 생존률은 APR-HAS 농도의 증가에 따라 감소하여 농도 1%에서 가장 높은 생존률을 보였다(Fig. 2).

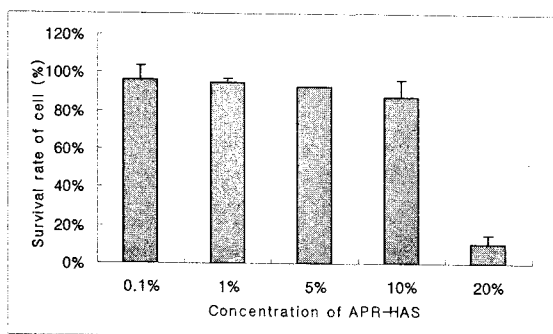
2. *in vivo*

1) 관절염 발병률 분석

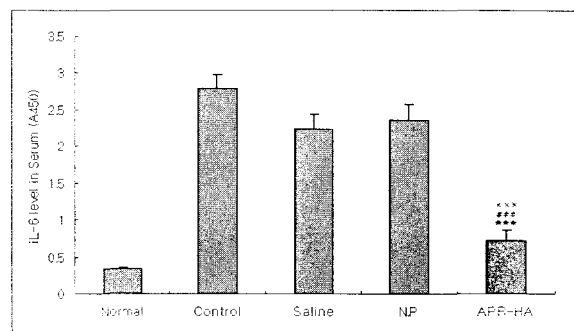
APR-HA군의 관절염 발병률이 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 3).

2) 관절염 지표(AI)

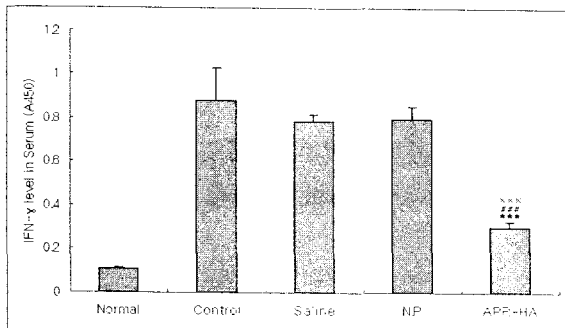
관절염 지표(AI)는 CII 1차 접종을 시점으로 12주 동안 관찰하였다. APR-HA군의 관절염 지표(AI)가 Control군, Saline군 및 NP군에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 3).



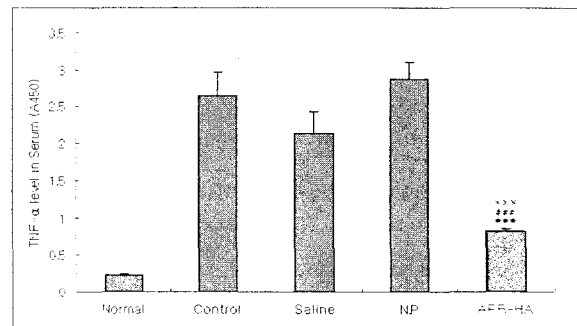
(A) The cytotoxicity of APR-HA solution



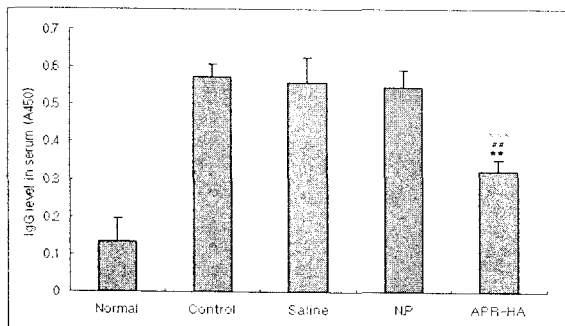
(B) IL-6 in serum



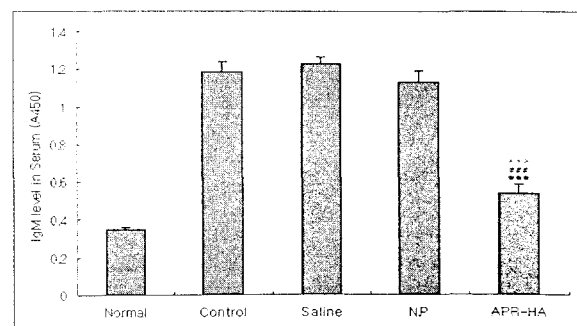
(C) IFN-γ in serum



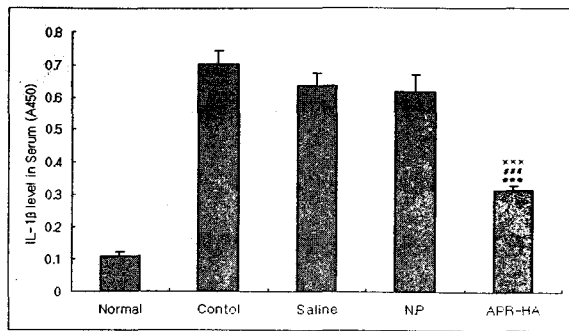
(D) TNF-α in serum



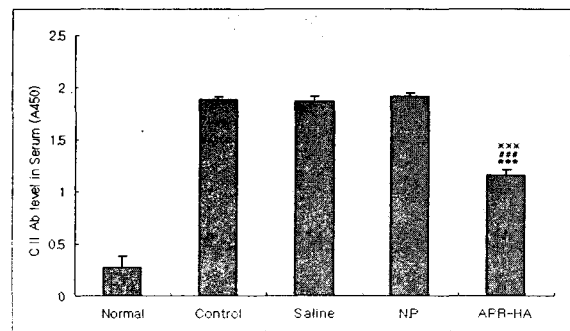
(E) IgG in serum



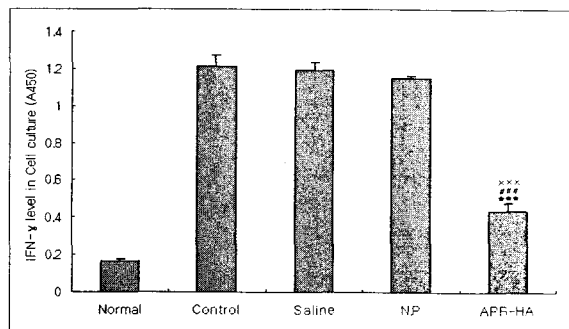
(F) IgM in serum



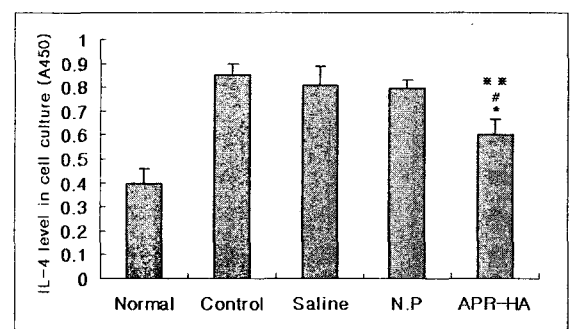
(G) IL-1β in serum



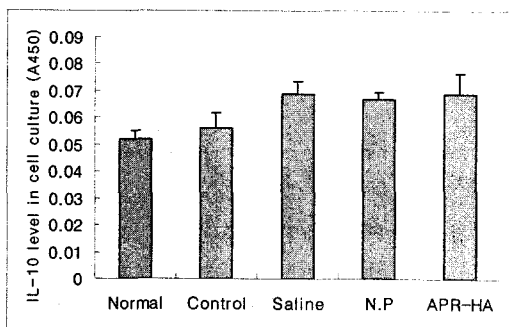
(H) CII Ab in serum



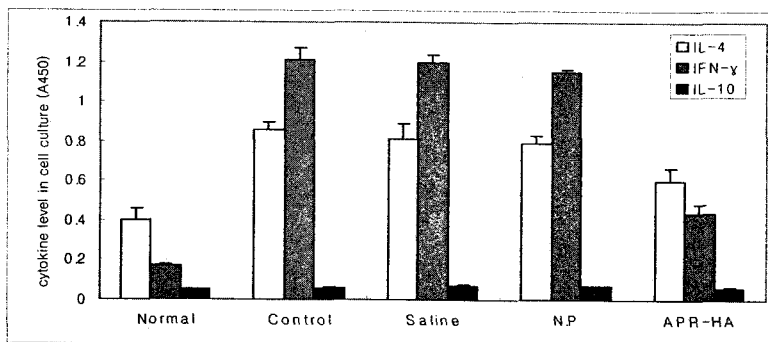
(I) IFN-γ in spleen cell culture



(J) IL-4 in spleen cell culture

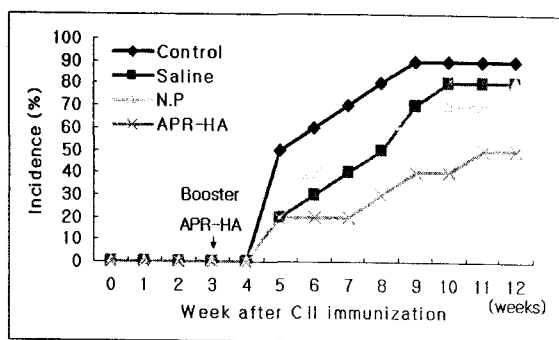


(K) IL-10 in spleen cell culture



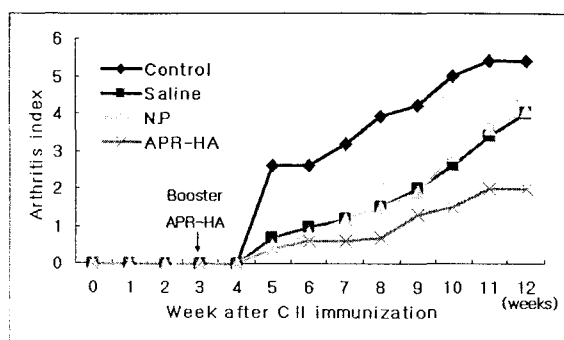
(L) IFN-γ/IL-4 and IFN-γ/IL-10 in spleen cell culture

Fig. 2. ELISA analysis

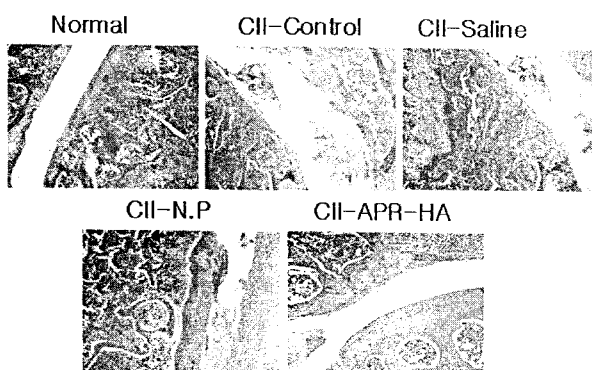


(A) The murine CIA incidence

Fig. 3. Observation

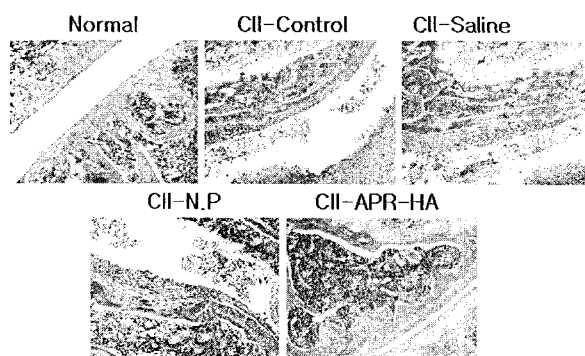


(B) The murine CIA arthritis index



(A) Sections from mouse joint

Fig. 4. Histological analysis



(B) Sections from mouse joint

3) ELISA analysis

(1) Serum

Serum IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 에서 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

Serum IgG, IgM, Anti-collagen II는 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

(2) Cell culture

CIA 생쥐의 비장세포 배양 상층액에서 IFN- γ , IL-4에서 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

CIA 생쥐의 비장세포 배양 상층액에서 IL-10는 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 별다른 차이가 없었다(Fig. 2).

Normal군의 비장세포 배양 상층액에서는 IL-4가 IFN- γ 의 2배 가량 되었으나, Control군에서는 IFN- γ

level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. APR-HA군에서는 IFN- γ 가 현저하게 감소하여 IL-4가 IFN- γ 보다 높은 수치를 나타내었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다(Fig. 2).

4) Histological analysis

(1) Hematoxylin and eosin stain

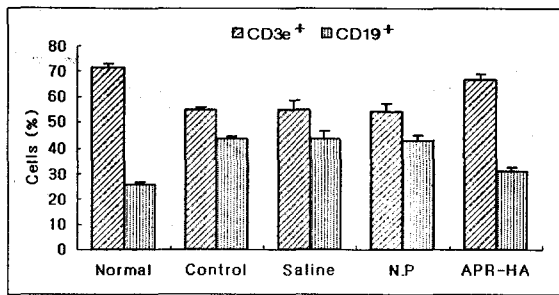
APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 연골의 파괴와 활막세포의 증식이 감소되었다(Fig. 4).

(2) Masson's Trichrome stain

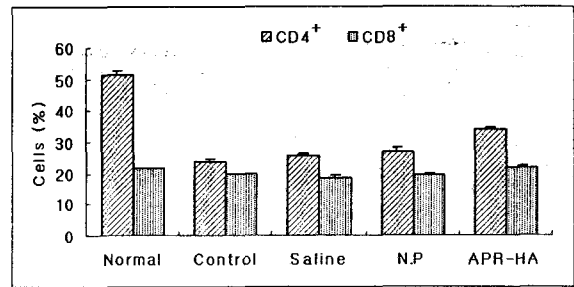
조직학적으로 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 collagen fiber가 Normal군에 가깝게 유지되었다(Fig. 4).

5) FACS analysis

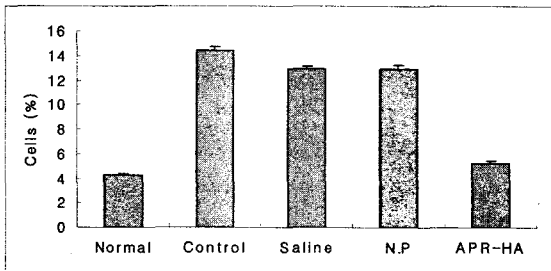
(1) CD3e⁺ 및 CD19⁺ in lymph node



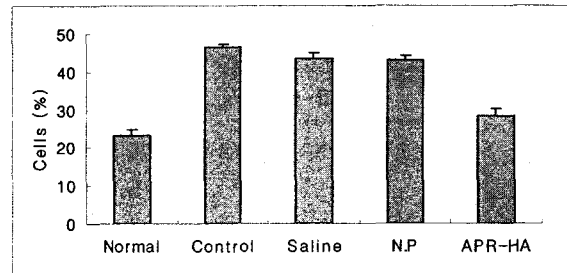
(A) CD3e⁺ / CD19⁺ in lymph node



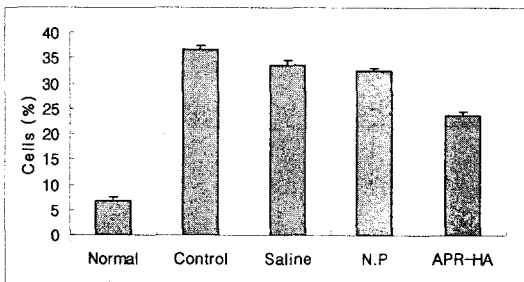
(B) CD4⁺ / CD8⁺ in lymph node



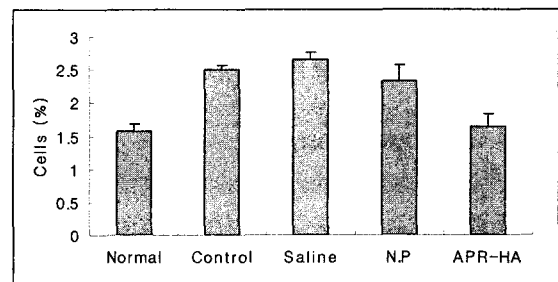
(C) CD3e⁺ / CD69⁺ in joint



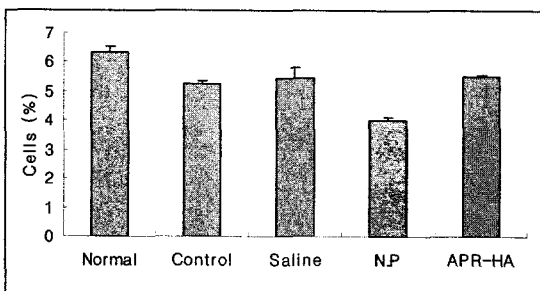
(D) CD11a⁺ / CD19⁺ in lymph node



(E) CD11b⁺ / Gr-1⁺ in lymph node



(F) CD4⁺ / CD25⁺ in spleen



(G) CD4⁺ / CD25⁺ in lymph node

Fig. 5. FACS analysis

림프절에서 T세포와 B세포상의 변화를 알아보고자 림프절내 CD3e⁺와 CD19⁺ 세포의 비율을 측정된 결과, APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 Normal군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 5).

(2) CD4⁺ 및 CD8⁺ in lymph node

림프절에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보고자 CD4⁺와 CD8⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, APR-HA군이 Control군, Saline군

및 N.P군에 비하여 Normal군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 5).

(3) CD3e⁺/CD69⁺ in joint

관절내 활성화된 T세포수의 변화를 알아보기 위하여 CD3e⁺/CD69⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 5).

(4) CD11a⁺/CD19⁺ in lymph node

림프절내 활성화된 B세포수의 변화를 알아보기 위하여 CD11a⁺/CD19⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과, APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 5).

(5) CD11b⁺/Gr-1⁺ in lymph node

림프절의 염증성 과립구수 변화를 알아보기 위하여 CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 비율을 관찰한 결과 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 5).

(6) CD4⁺/CD25⁺ in spleen

비장세포에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포는 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 감소하였다(Fig. 5).

(7) CD4⁺/CD25⁺ in lymph node

림프절내에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포는 APR-HA군에서 Normal군과 유사한 비율을 유지하였다(Fig. 5).

IV. 考 察

관절은 인체 각 부위에서 일어나는 屈伸과 回轉 運動을 촉진시키고 과도한 자극을 분산시키는 운동 기관으로²⁾, 《素門·五臟生成篇》에서는 “諸筋者皆屬於節, 血能養筋骨利關節”이라 하여 관절이 筋의 작용이나 血의 기능과 밀접한 관련이 있음을 말하고 있다.

관절에 외상, 감염, 대사이상, 면역이상, 종양 등의 결과로서 압통, 발열, 홍반, 활막액삼출, 활막비후, 관절운동의 제약 등의 증상이 유발되는 염증질

환을 관절염이라 하는데²⁾, 한의학적으로는 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺, 風痺, 痺症 등으로 해석하고 있으며, 크게는 痺證의 범주에 속한다고 볼 수 있다³⁾.

痺證의 원인에 대하여 《素問·痺論》에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕外邪가 痺證의 중요한 원인이라고 언급했으며, 《金匱要略》⁹⁾에서는 “短氣自寒出歷節疼不可屈伸此皆飲酒汗出當風所致”라 하였고, 《巢氏諸病源候論》에서 “由人體虛 腠理開故受風邪也”라 하였고, 《外臺秘要方》¹⁰⁾에서 “白虎病者大都是風寒暑濕之毒因虛所致將攝失理受此風邪經脈結滯血氣不行畜於骨節之間或在四肢肉色不變”, “血氣虛則汗出風冷搏於筋則不可屈伸爲歷節風也”라 하였으며, 《東垣十種醫書》¹¹⁾에서 “彼痛風者 因血受熱已自沸騰 其後 或涉冷水 或立濕地 或扇取涼 或臥當風 寒涼外搏 熱血 得寒 污濁凝澁 所以作痛”이라 하였고, 《鍼灸聚英》¹²⁾에서 痛風の 원인은 風熱, 風濕, 血虛有痰이라 하였고, 《醫學入門》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”, “鶴膝風…三陰虧損 風邪入 亦有虛火 陰血枯 所以病後 多此疾”이라 하였다. 또한 《萬病回春》에서 “痛風者…謂之白虎歷節風都是血氣風濕痰火 皆令作痛 或勞力寒水相搏 或酒色醉臥 當風取涼 或臥風濕之地 或雨汗濕衣 蒸體而成痛風 在上者多屬風 在下者 多屬濕”이라 하였고, 《景岳全書》에서 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得而 勝之而爲痺”라 하였고, 《證治彙補》¹³⁾에서 “痛風卽內經痛痺也 因氣血虧損 濕痰濁血 流滯經絡 注而爲病 或客四肢 或客腰背百節 走痛攻刺 如風之善動 故曰痛風”, “內因六慾七情 或病後亡津 血熱沸騰 亦必外感六淫 而後骨節鑽痛 久則手足躡攀 外因涉冷坐濕當風 亦必血熱而凝滯污濁 所以作痛 甚則身體塊瘰 痛必夜甚者 血行于陰也”라 하였고, 《醫學心悟》¹⁴⁾에서 “痺者 痛也 風寒濕三氣雜之 合而爲痺也”라 하였고, 《醫林改錯》¹⁵⁾에서 痺症有瘀血說을 주장하였고, 《血證論》¹⁶⁾에서 “身體不仁 四肢疼痛 今名痛風 古曰痺證 虛人感受外風 客於脈分 則爲血痺”라 하였다. 《三因方》¹⁷⁾에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보았고, 이들을 요약해보면 크게 體虛感邪, 外邪入侵, 停痰留瘀로 구분되고, 인체의 陽氣陰精不足을 內因으로, 風寒濕熱之邪를 外因으로 볼 수 있다.

즉, 痺證은 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 營衛失調,

腠理空疎, 正氣虛弱한 틈을 타고 인체의 肌表, 經絡을 침입하거나 관절에 凝滯됨으로써 기혈운행이 순조롭지 못하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利 및 심하면 관절의 강직성 변형을 일으키는 병증이다¹⁸⁾, 痺證의 주요한 임상 증상은 痛症이며, 病理的으로 氣血不通하여 나타나는 것이므로, 각종 痺證의 공통적인 치료는 宣通이며, 氣血과 營衛가 순행하면 痺痛은 자연스럽게 소실된다고 하였는데¹⁸⁾, 風寒濕熱의 邪氣에 의한 경우는 邪氣의 輕重에 따라 祛風, 散寒, 除濕, 清熱을 위주로 하여 活血祛瘀, 祛痰, 通氣, 發散, 消風, 消炎藥物 등이 활용되고, 虛症의 경우는 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝藥物 등이 배합되어 응용된다³⁾.

관절염을 한의학에서는 임상적으로 風濕性關節炎(rheumatic arthritis), 類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis) 및 骨關節炎(osteoarthritis) 등으로 구분하며, 그 중 류마티드 관절염은 여러 가지 관절질환 중에서 활막의 비대와 염증반응을 초래하여 주위조직의 괴사, 관절의 부종과 동통, 관절경직 및 운동제한 등을 일으키는 전신성 질환으로서, 그 원인을 內因으로는 氣血虛弱, 肌表不固, 勞倦內傷을 제시하고, 外因으로는 風寒濕熱의 外邪와 외상, 환자의 영양, 노동, 기거 조건과 밀접한 것으로 인식하고 있다³⁾.

서양의학적으로 류마티드 관절염은 원인불명의 만성 전신성 다발장기질환으로서, 말단의 가동관절(diarthrosis)을 침범하는 지속적인 염증성 활막염이 특징이며, 대칭적으로 분포하고, 활막의 과증식, 혈관형성, 관절연골과 연골하골의 침식 등이며, 결국 관절의 변형을 가져오는 자가면역 질환의 하나이다¹⁹⁾.

자가면역질환은 자기의 생체를 구성한 각종 성분에 대하여 항체를 만들거나 그 성분들에 대하여 세포성 면역반응이 일어나 생체에 조직손상을 유발하고, 병적상태를 초래하는 것으로, 임상적으로 자가항원에 반응하는 자가항체 또는 자가반응 T림프구를 확인할 수 있는 질병을 말한다²⁰⁾.

류마티드 관절염은 임상적으로 만성 다발성 관절염이 특징이며, 많은 경우 활막염이 나타날 때까지 피로, 식욕부진, 전신쇠약 등이 시작된다. 이런 전구증세는 수주 내지 수개월 지속되며 진단을 어렵게 한다. 전신증세는 몇 개의 관절 특히 손, 손목, 무릎, 발의 관절로부터 점차적으로 나타나고 대칭양상을 갖는다. 약 10%의 환자에서 발병이 급성으로 나타나고, 다발성관절염이 빠르게 발전하며, 열, 림프선염, 비장종대 등의 전신증상을 호소한다. 일부

환자에서는 증상이 초기에는 한 관절 또는 적은 수의 관절에만 국한되어 나타날 수 있다. 일부에서는 침범관절의 분포가 비대칭적이기는 하지만 대부분의 환자는 대칭적 분포를 나타낸다. 염증은 조직 손상에 대한 정상적인 방어기전으로서 정상적으로는 염증유발요인을 제거, 손상된 조직의 치유, 기능의 회복을 가져오지만, 류마티드 관절염과 같은 만성질환에서는 원인의 제거가 불가능하여 결국 계속되는 염증으로 인하여 조직의 손상에 따른 기능의 손실을 가져온다¹⁹⁾.

서양의학적 치료는 염증반응을 최소한으로 줄여 관절운동을 유지시키고 관절운동의 힘이 되는 근력을 유지시키며 2차적으로 관절의 강직 및 변형을 방지하는 것을 목적으로 하며²⁾, 치료방법으로 일반적 보존요법, 약물치료, 수술치료로 크게 나눌 수 있다. 일반적 보존치료인 기초요법은 적절한 영양공급과 안정, 휴식, 유발요인에 대한 처치, 물리치료 등을 실시한다. 현재까지 류마티드 관절염 치료에 사용 중인 약제로는 소염진통제(NSAIDs), 항류마티스제(DMARDs), 부신피질호르몬제제로 구분할 수 있으나, 이러한 치료는 서양의학적으로 원인이 정확히 규명되지 않은 상태에서 치료에 임하기 때문에 치료효율이 높지 않으며, 다양한 전신성 부작용을 초래하여 치료보다도 부작용이 더욱 심각해 지는 경우도 있다. 상기의 치료에도 불구하고 관절의 통증, 종창, 구축, 신경증세가 출현하거나 진행되면 외과적 수술을 시행하게 된다²¹⁾.

류마티드 관절염에 있어 관절조직의 국소 면역반응이 나타나는 특징이 있어 면역병리학적 기전을 살펴보면, 활액막에 T세포, 대식세포, 활액세포 등이 출현함이 특징이고, single-cell lining을 pannus라 부르는 충혈된 염증세포로 바꾼다. pannus안에서 염증, 증식, 체액성 및 세포성 면역반응이 연골과 결합조직을 파괴시키는 Metalloprotease과 다른 매개체의 방출을 유도한다. 이 중 특히 CD4⁺ T세포가 중요하다. 류마티드 관절염은 MHC class II HLA 항원과의 연관성이 가장 크며, MHC class II의 주된 기능은 CD4⁺ T세포에 항원성 펩타이드를 나타낸다¹⁹⁾.

활성된 CD4⁺ T세포는 단핵구, 대식세포, 활막섬유세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 생산하고, 조직을 파괴하는 MMP(Matrix Metalloprotease)를 분비한다. 즉 류마티드 관절염에서 연골과 골의 파괴는 대개 연골, 골, 활막 연결부의 침식에 의해 발생하며, 이는 주로 IL-1, TNF- α 등의 염증유발

cytokine에 반응한 대식세포나 섬유세포에 의해 생산되는 MMPs(주로 collagenase인 MMP-1, stromelysin인 MMP-3)에 의해 파괴된다. MMP, 특히 stromelysin(MMP-3)과 collagenase(MMP-1)은 결합조직의 기질을 파괴시키고, 류마티드 관절염에서 관절손상의 주된 매개체로 생각되는 효소이다. 또한 활성화된 CD4⁺ T세포는 osteoclastogenesis를 자극하여, IL-1, TNF- α 와 독립적으로 관절손상을 일으킨다¹⁹⁾.

류마티드 활막은 활성화된 림프구, 대식세포, 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물이 존재하는 것이 특징이며, 이들 cytokine의 국소적인 생산물이 류마티드 관절염의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 생각되고 있다. 이들 cytokine으로는 T림프구에서 나온 IL-2, IL-6, GM-CSF, TNF- α , TGF- β 등이 있고, 활성화된 대식세포에서 유래하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, 대식세포 CSF, TGF- β 등이 있으며, 이 외에 섬유세포, endothelial cell 등에서 분비하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, 대식세포 CSF 등이 있다. 이들 cytokine의 활성화도가 류마티드 활막염의 여러 양상인 활막조직염증, 활막염증, 활막증식, 연골과 골의 손상 등과 류마티드 관절염에서의 전신양상을 나타내는 원인으로 생각된다. 염증반응을 널리 전하는 cytokine의 생산에 덧붙여서 cytokine활동을 저해하는 특이억제물질(inhibitor)이 생산되며, T세포 활성화와 증식, B세포 분화와 염증부위로의 이동 등과 같은 특징적인 류마티드 염증반응을 억제하는 cytokine의 생산 등 염증을 느리게 하는 국소인자들이 또한 분비된다.

류마티드 관절염은 발생 및 발전과정이 기존의 면역학 기전과 동일하다고 볼 수 있으며, 치료의 목표는 소염, 통증억제 그리고 근본적으로는 비정상적 면역전개과정의 차단이라 할 수 있다²²⁾.

한의학적 치료는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 방법으로 鍼, 艾灸, 약물, 약침요법 등을 활용하고 있다^{3, 4)}.

鍼治療에 多用되는 經穴은 足三里, 環跳, 合谷, 膝關, 委中, 肩髃, 絕骨, 天井 등²³⁾이 있었고, 本 實驗에서 使用한 足三里(ST₃₆)는 면역기능을 강화시킬 수 있는 경혈²⁴⁾의 하나로, 足陽明胃經의 合穴, 六腑下合穴이며, 回陽九針穴, 四總穴, 中風七處穴 중의 하나이며, 調氣血, 理脾胃, 補虛弱하는 효능이 있어 슬관절통, 소화기질환, 乳痛, 허약체질, 빈혈, 피부소양증, 알러지성 질환, 臟氣虛憊, 眞氣不足, 産後血量 등의 질환에 광범위하게 응용되고 있다²⁵⁾.

한의학에서 면역의 개념은 《素問·上古天真論》에서 “眞氣從之 情神內守 病安從來”라 하였고, 또한 《素問·評熱病論》에서 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하여 질병을 인체의 正氣와 邪氣가 서로 다투는 과정이고, 正氣의 강하고 약함은 직접 질병의 발생, 발전, 변화와 轉歸를 결정한다고 인식하였다. 따라서 면역이란 역병의 위해를 제거한다는 것으로 인식하고 급성전염병 및 일반질병의 성립과정 중에서 생체의 저항성인 正氣를 면역의 개념으로 보았다. 正氣는 先天에 근원을 두고 後天에 의하여 充盛하게 되므로, 脾는 後天之本, 化生之源으로서 脾가 虛하게 되면 精微와 津液을 전신에 布散하지 못하고 淸氣를 올리지 못함으로써 中氣下陷, 統血失調 등의 병리가 발생하여 頭暈目眩, 倦怠乏力 등의 증상이 나타나고 더 나아가 각종 질환에 노출된다. 그리고 腎은 先天之本으로서 脾와 서로 협조가 되지 않으면 正氣가 虛損되고 外邪가 침입하여 少氣懶言, 腰膝痠軟, 形寒肢冷 등의 증상으로 나타난다고 하였다²⁵⁾.

최근에는 약침요법⁵⁾이 좋은 효과를 나타내고 있음이 보고되고 있는데⁶⁾, 약침요법은 穴位注射療法, 水鍼療法이라고 하며 경락학설의 원리에 의거하여 관련된 혈위나 압통점 혹은 체표의 축진으로 얻어진 양성반응점에 정제된 각종약물을 주입하여 자침효과와 약물의 약리작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고 질병의 치료효과를 높이는 신침요법으로, 약효가 빠르며 용량이 정확하고 약물이 위장관에서 파괴되는 것을 피할 수 있으며 내복하기 힘든 환자에게 사용할 수 있는 장점이 있다⁵⁾.

약침을 이용한 연구에 사용된 약물은 蜂毒, 附子, 草烏, 牛膝, 赤芍藥, 紅花, 紅花油, 續斷, 榆白皮, 桂枝, 木通, 黃柏, 澤蘭, 金銀花, 薏苡仁, 天授根, 梔子, 威靈仙, 丁公藤, 骨騰草, 斑猫 등이 있었으나, 獨活에 대한 연구는 부족한 점이 있었다. 또한 그동안의 약침연구는 adjuvant, collagen 등 면역반응을 일으키는 항원 혹은 T세포의 활성화유발제를 통한 혈액학적, 혈청학적, 조직학적 소견이 대부분이었으나, 점차 면역세포의 표식분자, 개별항체의 탐색, 조직별 염증성 cytokine의 농도 등의 검색에 분자생물학적인 방법을 응용하는 방향으로 전환되고 있다⁶⁾.

獨活(*Angelicae Pubescentis Radix*)은 우리나라 각지에 분포하는 五加科(두릅나무과)에 속한 獨活(九眼獨活)의 뿌리로서, 性味가 溫(微溫), 無毒, 辛苦하며, 腎·膀胱經에 歸經하여 祛風除濕, 解表止痛의 효능으로 風寒濕痺, 腰膝疼痛, 關節屈伸不利, 惡寒發

熱, 頭痛身痛, 肢體沈重을 치료한다. 風寒濕邪가 肌肉과 關節에 重着하여 나타나는 통증에 新舊를 막론하고 응용할 수 있으며, 더욱이 하지의 痺症에 유효한 약물이다⁷⁾. 독활의 약리작용에 대하여 한²⁶⁾ 등이 항염증 효과가 있음을 보고하였다.

관절염의 대표적 동물실험모델로서 콜라겐 유발 관절염(collagen-induced arthritis, CIA)이 류마티드 면역학적 기전의 연구와 치료약물의 약리효과를 조사하는데 활용되고 있다²⁷⁾.

Collagen은 동물의 진화 과정 중 주위환경의 영향과 기능적 요구에 따라 경직성, 탄성 및 강도가 서로 다른 일련의 단백질이 발달한 것을 말하며, 척추동물에 있어서 가장 많고 여러 곳에 산재해 있는 단백질이다. 이것은 인간을 비롯한 척추동물 체내 단백질의 30% 정도를 차지하는데, 주로 피부, 골, 연골, 평활근 및 기저판 등에 존재한다²⁸⁾. 그 종류는 12가지 이상이 알려져 있으나, 가장 흔하고 연구가 많이 되어 있는 것이 I·II·III·IV·V형으로 그 중에 제II형 collagen은 연골조직에 국한되어 주로 연골, 귀, 추간판, 초자체, 각막, 망막 등에 존재한다²⁹⁾. 관절질환의 분자표식은 주로 특이항체를 사용한 연골성분의 면역화학적 측정에서 집중되어 있는데, 제II형 collagen은 관절연골 교원질의 90% 이상을 차지하고 있으며, 연골 파괴의 표식자로 이용되고 있다. 제II형 collagen을 쥐에게 피내주사하여 관절염이 발생함을 1977년 Trendem³⁰⁾ 등이 처음 보고한 이래, 설치류에서 제II형 CIA은 임상적, 조직학적, 면역학적으로 사람의 류마티드 관절염과 유사하여 이 질환의 질병과 병태연구에 많이 이용되고 있다^{31, 32)}.

이는 류마티드 관절염이 발생되었을 때 CIA와 유사한 증상을 나타내는데 근거하고 있다. 그러나 CIA는 류마티드 관절염과는 달리 collagen을 주사하여 유도한 항원유도성 자가면역질환이기 때문에 류마티드 관절염에서 나타나는 피하결절, 폐섬유증상과 같은 합병증이 나타나지 않고 발병기간이 비교적 짧으며, rheumatoid factor(RF)가 검출되지 않는 등의 병리학적 및 면역학적 특징의 차이를 나타내는 것으로 보고되고 있다²⁷⁾.

CIA의 증상은 갑자기 발생하여 임상적으로 사지의 수족관절과 고관절에 종창, 홍반, 부종, 통증으로 인한 운동장애가 나타난다³³⁾. 또한 조직학적으로는 증식성, 염증성 관절염의 특징을 보여 활막비대와 부활막조직에 염증세포의 침착 및 세포의 관절영역으로의 유주, 경계영역의 파괴, 골막염, 연골표면의

단편화가 일어나며, 면역학적으로는 다양한 면역담당세포들이 활성화된 특징을 보여 류마티드 관절염과 유사한 증상이 나타나기 때문에 이 질환의 발생 기전을 연구하는 중요한 모형으로 널리 이용되고 있다^{27, 34)}.

이러한 이론적 근거를 기반으로 足三里(ST₃₆)에 시술한 독활약침이 생쥐의 CIA에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자, 관절염 발병률 및 지표 분석, 효소연관면역분석법(ELISA)에 의한 비장세포 배양 상층액과 혈청의 cytokine 측정, 유세포분석기(flow cytometer)를 이용한 림프절과 관절의 형광활성세포 분석 등을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

獨活藥鍼液(APR-HAS)의 *in vitro* 세포독성을 알아보기 위해 농도 0.1%, 1%, 5%, 10%, 20%로 실험한 결과 세포생존률은 1%에서 가장 높게 나타났다(Fig.2). 정상세포에서 세포독성을 나타내지 않는 농도는 1%이하가 적당하다고 사료되어 APR-HAS 1%를 실험에 사용하였다.

Collagen type II(CII) 2차 접종(21일)이후 부터 관절염이 발병하기 시작하였으나, APR-HA군에서는 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 관절염 발병률과 지표(AI)가 낮게 나타났다(Fig. 3).

Cytokine에 의한 RA억제기전에는 IL-4, IL-6, IL-10, 그리고 IL-13등을 들 수 있다. IL-4, IL-10, 그리고 IL-13은 RA환자에서 IL-1 β 와 TNF- α , IL-6, IL-8의 전사를 억제하여 과잉생산을 억제시키고, 특히 IL-10은 IL-1 β , TNF- α 의 수준을 억제하는데 가장 효과적이다. IL-4는 cytokine mRNA의 감소비율을 증가시키며, IL-4와 IL-13은 IL-1억제제인 IL-1Ra의 분비를 강하게 증가 시킨다. IL-10은 T cell, macrophage, monocyte, dendritic cell 등에서는 면역억제기능을 하고, B세포, 내피세포 등에서는 면역자극작용의 상반된 작용을 한다³⁵⁾.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 대표적인 염증유발 cytokine으로 synovial 세포에서 과잉생산되어 synovial 세포의 증식을 촉진한다²⁰⁾.

IL-1은 159개의 아미노산으로 구성된 IL-1 α 와, 269개의 아미노산으로 이루어진 IL-1 β 의 2종류가 있다. IL-1은 임파구 뿐만 아니라 매우 많은 종류의 세포에 작용하는 것으로 알려져 있는데, 섬유아세포, 연골세포, 골파괴세포, 활막세포, 근세포 등에 작용해서 각종의 단백질 분해효소를 만들게 하며 조직구축의 파괴를 유도하여, 감염에 대한 숙주의 급성기 반응의 다양한 작용을 매개해서 이 시기의 생체방어

에 있어서 중요한 역할을 담당한다²⁰⁾.

IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는, 급성 조절 단백질로서 류마티드 관절염의 염증반응에 주된 매개 작용으로 혈청 및 관절액의 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가하며, 골관절염보다 높은 활성도를 보여 류마티드 관절염의 활성도와 연관성이 있다.

TNF- α 은 IL-1 β 와 마찬가지로 주로 macrophage에서 분비되고, 류마티드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, 호중구, 림프구, 단핵구의 화학유주 및 섬유모세포증식 활막섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE2와 collagenase 생산을 촉진한다.

Interferon(IFN)에는 α , β , γ 의 3종류가 있는데 IFN- α 는 백혈구에서 생성되고, IFN- β 는 virus 감염 섬유아세포에서 생성되며, IFN- γ 는 활성화된 T림프구에서 생성된다.

3종류의 IFN에 공통으로 나타나는 활성은 virus 감염의 저지, 세포증식의 억제, NK 세포, Tc 림프구, B 림프구의 활성화, MHC 항원발현의 촉진 등인데, 면역계에서 가장 강하게 작용하는 것은 IFN- γ 이며, 이 IFN- γ 에 특징적으로 나타나는 활성에는 MHC class II 항원과 IgG Fc 수용체의 발현 유도, macrophage의 활성화 등이 있다.

IFN- γ 는 외부침입자와 후천성 면역 등에 대한 숙주의 방어에 중심적 역할을 가진다. IFN- γ 는 T세포와 NK세포로부터 분비되고, IL-12에 의하여 생성이 유도된다는 주장과 IL-2, TNF, IL-1에 의하여 NK세포에서 유도된다는 주장이 있다²⁰⁾.

혈청의 IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ 는 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있는 감소($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)를 보였다(Fig. 2).

혈청의 INF- γ 가 유의성 있게 감소한 것은 면역매개물질로 작용하는 INF- γ 생성의 차단 효과를 의미한다고 생각된다(Fig. 2).

Immunoglobulin(Ig)은 림프구에 의해 막형(membrane) 또는 분비형(secreted form)으로 생산되는 당단백질의 일원이다. 막형 항체는 항원에 의한 B세포의 활성화를 매개하는 수용체 역할을 하며, 분비형 항체는 항원을 제거하는 데 보충되는 다양한 분자적, 세포적 작동 기능을 수행하게 하는 특이적 체액성 면역의 매개자로서 역할을 담당한다. B세포는 막결합 Ig를 생산하지만, 항원에 노출된 이후에는 다른 면

역세포와 여러 가지 cytokine의 활성 증가로 인해서 분비형 Ig를 생산하는 형질세포(plasma cell)로 분화가 가속된다.

류마티드 관절염 환자의 B림프구는 혈청이나 관절 내에서 자가항체인 IgG, IgM 등과 항원에 따른 항체를 분비하며, 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 Ig의 Fc부위에 대한 자가항체인 류마티드 인자(rheumatoid factor, RF)를 생성한다. IgG와 RF가 항원-항체 복합물을 형성하면 보체를 활성화 시키는 화학 매개물이 방출되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 방출하여 활막세포 파괴와 염증반응을 일으킨다. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체내에서 류마티드 관절염의 활동성과 관련한 지표가 된다. IgM-RF는 류마티드 관절염환자의 2/3에서 양성으로 나타나며, 측정이 용이하여 임상에서 주로 이용된다³⁶⁾.

혈청의 IgG는 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.01$)하였으며, IgM도 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)하여 독활약침이 B세포의 Ig 생산에 현저한 억제효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

관절염 발생 초기에는 B림프구가 관계하는 체액성 면역반응이 보다 중요한 역할을 하는데, B림프구의 표면에서 방출되는 IgG 항collagen 항체는 제II형 collagen에 대한 특이반응을 보인다. 이 항체가 증가하는 경우 관절염이 발생하며, 일반적으로 항체정도와 관절염의 심한 정도는 관련이 있어 이를 측정하여 관절염의 객관적 지표로 이용하고 있다³⁷⁾.

APR-HA군 혈청의 항collagen II가 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)하여, 독활약침이 collagen type II에 대한 항체 형성 억제효과를 관찰하였다(Fig. 2).

IL-10은 면역실행세포의 작용과 염증반응을 억제하는 광범위한 면역조절 cytokine이다. IL-10은 활성화된 macrophage와 수지상세포가 IL-12와 TNF를 생성하는 것을 방해한다. IL-12는 IFN- γ 분비의 결정적인 자극제이고, 세포 내 세균에 대한 선천면역과 적응면역의 유도물질이기 때문에 IL-10은 그런 모든 반응을 하향 조절한다. 또한 IL-10은 macrophage 표면의 동시자극자(costimulator)와 class II MHC 분자의 발현을 방해한다. 이 작용 때문에 IL-10은 T세포의 활성화를 저해하고, 세포매개 면역반응을 종결시키는 작용을 한다.

비장세포 배양 상층액에서 IL-4는 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)하였는데, 이는 APR-HA에 의한 면역억제 효과로 생각된다(Fig. 2).

비장세포 배양 상층액에서 IL-10는 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 별다른 차이가 없었다(Fig. 2).

비장세포 배양 상층액에서 IFN- γ 가 APR-HA군이 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)하였는데, 이는 APR-HA가 면역매개물질로서 작용하는 IFN- γ 의 생성을 차단하는 것을 의미한다고 생각된다(Fig. 2).

관절 조직의 구조를 관찰하기 위하여 Hematoxylin and eosin stain 염색법으로 관절 조직을 관찰한 결과, APR-HA군에서는 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 연골의 파괴와 활막세포의 증식이 적었다(Fig. 4).

교원섬유(collagen fiber)의 축적 정도를 알아보기 위해 실시한 Masson's Trichrome stain 염색법으로 관찰한 결과, APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 collagen fiber가 Normal군에 가깝게 유지됨이 관찰되었다(Fig. 4).

면역세포는 세포의 종류나 분화 단계에 따라서 특징적인 표면분자(cluster of differentiation, CD)를 표현한다. 이들 표면분자에 결합하는 개별적인 항체에 형광물질을 부착시킨 후에 이 형광물질의 양을 측정함으로써 특정 면역세포의 생성량을 측정할 수 있다. 실험에서 측정된 CD의 감소는 면역반응에 관여하는 면역세포의 감소를 의미한다. 면역세포는 혈관과 림프관에서 일정농도를 유지하고 있는데, 특정 물질에 의한 특정 면역세포의 감작은 이에 해당하는 다량의 면역세포를 생산하도록 한다. 골수에서부터 말초 림프기관까지의 과정에서 면역세포의 생성을 억제하는 다양한 경로가 존재한다.

CD19는 B세포에 있고 B세포 리셉터의 협조자(co-B cell Receptor)로서 CD21과 복합체를 이루어 신호 형질유입의 역할을 하고, B세포의 발달 초기단계에서부터 plasma cell의 최종 분화단계까지 발현된다³⁹⁾.

면역초기에 T세포는 CD9, CD10 등을 가지고 있으나, 세포가 성숙하면서 CD4, CD3, CD8 등을 얻게 되며, 성숙된 흉선 세포는 두 개의 종류로 분리되는데, CD4와 CD8이다. CD4⁺는 T세포의 helper 세포에 의한 항원인식과 관련이 깊으며, B 세포에 항원

을 전달하여 항체생성을 유발하며, 류마티드 관절염의 면역학적 병인에 중요한 역할을 한다. CD3는 항원 수용체 부위로 작용하고 있다. CD8은 억제 T세포 혹은 세포독성 T세포에 항원을 전달한다³⁹⁾.

CD69는 휴지기 림프구에서는 발현되지는 않지만, T세포가 활성화되면 2시간 이내에 발현이 되어 초기 활성화인자로 불리는 세포표면 단백질이며, 활성화된 T 및 B세포, 대식세포, NK세포에서도 발현이 된다. T세포와 내피세포 간의 상호작용에 있어 T세포를 활성화 시키는데, CD69 같은 다양한 표면표시인자들의 발현이 증가된다³⁹⁾.

CD11a는 백혈구에서 발현이 되고, CD18과 짝을 이루며 부착과 세포의 이동작용을 한다³⁹⁾.

림프절의 CD3e⁺와 CD19⁺의 세포 비율은 T세포와 B세포의 비율을 관찰한 것으로, APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 Normal군과 유사한 비율이 유지됨을 관찰하였다(Fig. 5).

림프절의 CD4⁺와 CD8⁺의 세포 비율은 보조 T세포와 억제 T세포의 비율을 관찰한 것으로, APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 Normal군과 유사한 비율이 유지됨을 관찰하였다(Fig. 5).

림프절의 CD3e⁺와 CD69⁺의 세포비율은 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저히 감소하여, 독활약침이 CIA 생쥐 림프절의 활성화 T세포 수를 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 5).

림프절의 CD11a⁺와 CD19⁺의 세포비율은 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저히 감소하여, 독활약침이 CIA 생쥐 림프절의 활성화 B세포 수를 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 5).

관절의 CD11b⁺와 Gr-1⁺의 세포비율은 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저히 감소하여 독활약침에 의한 CIA 생쥐 관절의 과립구 감소효과가 관찰되었다(Fig. 5).

비장세포에서 CD4⁺와 CD25⁺의 세포비율은 APR-HA군에서 Control군, Saline군 및 N.P군에 비하여 현저히 감소하여, 독활약침이 CIA 생쥐 림프절의 활성화 B세포 수를 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 5).

림프절의 CD4⁺와 CD25⁺의 세포비율은 APR-HA군이 Normal군과 유사한 비율을 유지함을 알 수 있었다(Fig. 5).

본 실험에서 Saline군 및 N.P군에서도 Control군에 비해 유의성이 없는 감소효과가 관찰되었는데, 이는 CIA 생쥐에 대한 항염증 효과가 단순한 경혈

자극에 의한 것이었다기 보다는 독활약침액의 작용으로 인한 것이었음을 의미한다고 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 보면 독활약침은 *in vivo* 와 *in vitro*에서 CIA(collagen-induced arthritis) 생쥐에 작용하여 항염증 효과가 있음을 알 수 있었으며, 향후 임상적 활용을 위한 보다 적극적이고 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 結 論

足三里(ST₃₆) 부위에 시술한 獨活藥鍼(APR-HA)이 collagen type II(CII)로 관절염을 유발시킨 DBA/1J 생쥐에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 관절염 발병률과 관절염 지표, 효소연관면역분석법에 의한 비장세포 배양 상층액과 혈청의 cytokine 측정, 조직학적 변화, 유세포분석기를 이용한 림프절과 관절의 형광활성세포분석 등을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. APR-HA군의 관절염 발병률과 관절염 지표(AI)가 감소하였다.
2. APR-HA군의 혈청에서 IL-6, INF- γ , TNF- α , IgG, IgM, IL-1 β , Anti-collagen II가 유의성 있게 감소하였다.
3. APR-HA군의 비장세포 배양 상층액에서 INF- γ , IL-4가 유의성 있게 감소하였다.
4. APR-HA군의 관절에서 연골파괴와 활막세포의 증식이 감소되었고, 교원섬유가 Normal군에 가깝게 유지되었다.
5. APR-HA군의 림프절에서 CD3e⁺/CD19⁺와 CD4⁺/CD8⁺는 Normal군과 유사하게 유지되었다.
6. APR-HA군의 관절에서 CD3e⁺/CD69⁺는 현저히 감소하였다.
7. APR-HA군의 림프절에서 CD11a⁺/CD19⁺와 CD11b⁺/Gr-1⁺는 현저히 감소하였다.
8. APR-HA군의 비장세포에서 CD4⁺/CD25⁺는 감소하였다.
9. APR-HA군의 림프절에서 CD4⁺/CD25⁺는 Normal군과 유사하게 유지되었다.

VI. 參考文獻

1. 金寅相. 整形外科 Rehabilitation. 서울 : 一中社. 1988 : 7-8.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 2001 : 175-189.
3. 權宰植. 痺證. 서울: 鼎談. 1993 : 207-208, 214-215, 219-222, 270.
4. 白洪龍. 常見病症辨症診治概要. 雲南省 : 雲南人民衛生出版社. 1984 : 382-385.
5. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용(2). 서울 : 대한약침학회. 1997 : 1-5.
6. 유호상. 關節炎에 관한 韓醫學 碩·博 論文 73編에 대한 分析. 대전대학교 대학원. 2001.
7. 康秉秀. 本草學. 서울 : 永林社. 1991 : 260-261.
8. 임윤경, 김태한. 大學經穴學 各論. 대전 : 오비기획. 2005 : 197-207.
9. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北 : 東方書店. 1950 : 30-39.
10. 王燾. 外臺秘要方. 서울 : 大星文化社. 1983 : 424.
11. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울 : 大星文化社. 1983 : 480-481.
12. 高武. 鍼灸聚英. 上海 : 上海科學技術出版社. 1978 : 32-33, 175.
13. 李用粹. 證治彙補. 台北 : 旋風出版社. 1976 : 198-206.
14. 程國彭. 醫學心悟. 香港 : 友聯出版社. 1961 : 171-174.
15. 王清任. 醫林改錯. 台北 : 台聯國風出版社. 1975 : 65.
16. 唐容川. 血證論. 台北 : 力行書局有限公司. 1984 : 168.
17. 陳無擇. 三因方(卷3). 大連 : 國風出版社. 1977 : 2-3.
18. 全國韓醫科大學 再活醫學科學教室. 東醫再活醫學科學. 서울 : 書苑堂. 1995 : 95-96, 111-116.
19. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학. 군자출판사. 1996 : 1265.

20. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1997 : 100, 114, 117, 122-131, 179, 180, 253, 255, 262, 266-269.
21. 김성윤. 류마티스관절염의 내과적 치료. 서울 : 大韓醫學協會誌. 1992 ; 35(10) : 1223-1229.
22. 朴慶寔. 刺鍼이 류마치스성 關節炎에 미치는 효과. 大韓東醫病理學會誌. 2000 ; 12(2) : 49.
23. 全國韓醫科大學鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1988 : 21, 389, 1457, 4-217, 489-490, 730-732, 1408-1409.
24. 서범석. 免疫과 관련된 腧穴 考察. 대전대 논문집. 1994 ; 2(2) : 133-161.
25. 낙화생. 면역과 한방. 서울 : 열린책들. 1998 : 15-48.
26. 한용남. 독활의 항염증 유효 성분 Continentalic acid 화학구조. 생약학회지. 1982 ; 13(4) : 169.
27. Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hmaoka T, and Fujiwara H. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen induced arthritis. Arthritis Rheum. 1992 ; 32 : 594-600.
28. Morgan K et al. Native type II collagen induced arthritis in the rat. Incidence and humoral response to collagen. Annals of the Rheumatic Disease. 1980 ; 39 : 285-290.
29. 김노경. 내과학. 서울 : 고려의학. 1998 : 877-878, 884.
30. Trendam DE et al. Autoimmunity to type II collagen, An experimental model of arthritis in rats. J.EXP. Med. 1977 ; 146 : 857-868.
31. 박동준. 흰쥐의 第II型 collagen 誘發 關節炎, IgG 抗collagen抗體의 變化. 大韓內科學會誌. 1991 ; 41(13) : 423-428.
32. Cremer MA et al. Collagen induced arthritis in rodent, a review of clinical, histologic feature. Rymachi. 1984 ; 24 : 45-66.
33. Wooly PH. Collagen induced arthritis in the mouse. Methods Enzyme. 1988 ; 162 : 361-373.
34. Hom JT, Brendele AM, and Carlson DG. In vivo administration with IL-laccelerates the development of collagen induced arthritis in mice. J Immunol. 1988 ; 141 : 834-841.
35. Morita Y. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10 and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium. Rheumatology International. 2001 ; 20(2) : 49-54.
36. Wang H et al. Regulation of autoreactive anti-IgG(rheumatoid factor) B cells in normal and autoimmune mice. Immunol Res. 1999 ; 19(2-3) : 259-270.
37. Cremre MA et al. An experimental model of relapsing polychon ddritis induced with arthritis type II collagen. J.Exp. Med. 1981 ; 154 : 535-540.
38. Robert RR et al. Clinical immunology. New York : Mosby. 2001 ; 4 : 13, 6 : 18.
39. 하대유. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 242, 404, 408-409.