

원저

足三里 桑枝藥鍼이 Collagen-induced arthritis에 미치는 영향

정영돈* · 임윤경** · 이현*

*대전대학교 한의과대학 침구학교실

**대전대학교 한의과대학 경혈학교실

Abstract

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

Jeong Yeong-don*, Yim Yun-kyoung** and Lee Hyun*

*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

**Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Daejeon University

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

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-1 β , 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 and CD11b+/Gr-1+ cells and CD4+/CD25+ cells.

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

2. In MR-HA, the levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , 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.

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

4. In the MR-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-1+ cells and CD4+/CD25+ cells were decreased in synovium.

Conclusion : These results suggest that MR-HA at ST36 has an effect to control synovial cell proliferation and cartilage destruction in rheumatoid arthritis, as well as prophylaxis is important to treat rheumatoid arthritis in clinic.

Key words : Rheumatoid arthritis(RA), Mori Ramulus, Herbal-Acupuncture, ST36, Collagen-induced arthritis(CIA)

I. 緒 論

關節炎은 여러 가지 關節疾患 중 滑膜의 慢性的 肥大와 炎症反應을 招來하여 周圍組織의 壞死, 關節의 浮腫과 疼痛, 關節硬直 및 運動制限 등을 일으키는 自家免疫疾患으로서¹⁾ 韓醫學의으로는 痺症, 頑痺, 歷節風, 痛風, 白虎歷節風, 鶴膝風, 類風濕性關節炎 등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있다²⁾.

류마토이드 關節炎의 病因은 아직 完全하게 밝혀지지 않았지만, 感染, 호르몬의 不調和, Vitamin 缺乏, 遺傳的 要因 및 自家免疫反應 등으로 알려져 있으며³⁾, 環境의인 要因과 遺傳的 要因들이 複合적으로 作用하여 關節炎이 發生되는 것으로 추정하고 있다⁴⁾. 이러한 原因에 의하여 免疫 調節 機轉의 이상이 초래되고, 慢性 炎症이 특히 關節을 중심으로 지속되고 相關된 細胞, 즉 림프구, 대식세포, 섬유화 세포 등에서 분비된 각종 cytokine과 단백질 분해 효소를 비롯한 다양한 炎症 誘發 因子에 의해 組織의 損傷이 지속적으로 일어난다고 인정되고 있다^{4,5)}.

류마토이드 關節炎의 韓方의 病因은 肝腎·氣血·陰陽의 虛로 인한 內因과 風·寒·濕·熱邪의 感受로 인한 外因 및 內外가 相合하여 發生하며, 辨證類型에 따라 施治한다⁶⁾. 桑枝는 祛風通絡, 祛風濕, 利關節⁷⁾ 등의 效能이 있어 外因의 辨證에 부합되는데 기존 류마토이드 關節炎에 관한 藥鍼 實驗 研究를 살펴보면 秦艽, 草龍膽, 草烏, 加味疎風活血湯 등이 adjuvant 關節炎에, 澤蘭, 赤芍藥, 木防己 등이 collagen 誘發 關節炎에 각각 有效하다고 하였으나

桑枝에 대한 報告는 접하지 못하였다.

이에 저자는 桑枝로 藥鍼液을 製造한 후, Collagen-induced arthritis (CIA) mouse의 足三里(ST36)에 桑枝藥鍼을 施術하여, 류마토이드 關節炎과 相關된 각종 cytokine 및 免疫細胞를 分析하여, 關節炎 發病率과 關節炎 指標(AI), 각종 cytokine, 면역글로블린 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 結果를 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 使用된 桑枝(Mori Ramulus; 이하 MR로 표기)은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 使用하였다.

3) 藥鍼液

粉碎機를 利用해서 桑枝 55g을 粉碎하여 粉末로 만들어, 圓形 三角 flask에 넣고 蒸溜水 500ml를 加하여 3時間 동안 shaking water bath에서 流出한 후, 流出液을 濾過하였다. 이 濾過液을 濾過紙로 3回 濾過한 후, rotary evaporator에 減壓濃縮 하였다. 이 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30ml를 加하여, 室溫에서 攪拌한 후 放置하여, 沈澱物이 生成되게 한 후 濾過하였다. 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮하한 후, 濃縮液을 다시 濾過 하였다. 이 濾過液에 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 攪拌 후 放置하여, 沈澱物이 生成되게 한 후 濾過하였다. 濾過液에 75% ethyl alcohol 30ml를 加하고 攪拌한 후 放置하였다가 濾過하는 操作을 2回 反覆하였다. 濾過液中的 ethyl alcohol 成分을 rotary evaporator로 減壓 除去하고, 남은 濃縮液이 20ml가 되게 하였다. 1N NaOH를 이용하여 濃縮液을 pH6.8이 되도록 調節하고, 低溫에서 12時間 放置한 후 滅菌하였다. 滅菌된 濃縮液에 人산완충생리식염수(PBS)를 加하여 1%로 稀釋하여 藥鍼液으로 使用하였다

2. 方法

1) In vitro

(1) 細胞毒性 測定

細胞毒性 測定方法은 SRB assay⁸⁾ 법을 응용하여 實驗하였다.

① Mouse lung fibroblast cell(mLFC) 培養

BALB/c 생쥐의 lung 조직을 D-PBS로 3회 洗滌한 후 작은 조각으로 切斷하여 conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하고 tube에 Dulbecco's Modified Eagle Medium {DMEM; containing collagenase A(5mg/ml)와 DNase type(0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 104U/m, streptomycin

10mg/ml, amphotericin B 25µg/ml))을 넣고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 培養하였다. 0.5% trysin -0.2% EDTA를 添加하고 30분간 계속 培養한 후 PBS로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리하였다. DMEM-10% FBS에 일주일 동안 培養한 후 0.5% trysin-0.2% EDTA로 mLFC 細胞를 分離하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105cells/ml 濃度로 맞추어 96well plate에 분주하였다.

② SRB assay 법

mLFC 細胞는 37°C 5% CO₂ 배양기에서 1시간 培養한 후 桑枝藥鍼液(0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%)을 처리하여 48시간 동안 培養하였다. 培養 후, 培養液을 버리고 PBS로 2회 洗滌하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid) 50µl를 가하여 4°C에서 1시간 동안 放置한 후 蒸溜水로 5회 洗滌한 다음 well plate를 공기 중에서 乾燥하였다. 각 well당 100µl씩 SRB(0.1% acetic acid)용액을 가하고 室溫에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid로 4회 洗滌한 다음 공기 중에서 乾燥하고 10mM Tris Base로 각 well당 100µl씩 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 5분간 shaking 한 후 흡광도 (540nm)를 測定하였다

2) In vivo

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

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

DBA/1J 생쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 Normal群, Control群, Saline群, N.P(needle prick)群, 桑枝藥鍼(MR-HA)群의 5群으로 나누고, Normal群을 제외한 각 群에 CII를 2차(0일, 21일)에 걸쳐 각 0.1ml(CII 100µg)의 CII를 꼬리 基部에 接種하였다⁹⁾(Fig. 1).

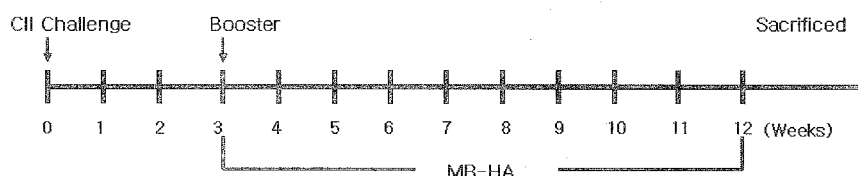


Fig. 1. Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model

(2) 取穴

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 右側 足三里 (Joksamni; ST36)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 0.2ml를 주 3회 足三里(ST36)에 注入하였다.

N.P(needle prick)群은 CII 2차 접종 이후부터 주 3회 足三里(ST36)에 26 gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 刺入하고 즉시 제거하였다.

桑枝藥鍼(MR-HA)群은 CII 2차 접종 이후부터 右側 足三里(ST36)에 1%의 桑枝藥鍼(MR-HA) 0.2 ml를 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 實驗群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 score를 계산하였다¹⁰⁾.

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

Arthritis score =유발된 動物의 단계별 關節염 지 수의 합 / 전체 動物 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 40µm nylon mesh에 갈아서 脾臟細胞를 얻었다. 脾臟細胞를 5% FBS와 antibiotics(penicillin 100U/ml, streptomycin 100µg/ml)가 포함된 RPMI 1640 medium (Sigma, USA)을 넣어서 5×10⁶ cells/ml 濃度로 맞추고 50µg/ml의 CII 또는 anti-CD3/CD28 抗體가 coating되어 있는 96 well plate에 分株하여 37°C CO₂ 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 3H-thymidine 0.25µCi을 넣어 37°C CO₂ 培養基에서 8時間동안 培養한 후 測定 하였다¹¹⁾.

(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 흡광도(450nm)를 測定하였다.

(7) Histological analysis

DBA/1J 생쥐의 다리 關節 部位를 取하여 Cryotome을 利用하여 切片한 후, Hematoxylin and eosin염색 (DakoCytomation, Japan)과 Masson's trichrome 염색(DakoCytomation, Japan)을 하였다.

(8) Fluorescence activated cell sorter(FACS) analysis

① Lymph node 細胞 分析

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

② 關節內 細胞 分析

생쥐에서 分離해 낸 다리關節을 잘게 切斷한 후 collagenase를 加하고 培養하여 分離해 낸 細胞에 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

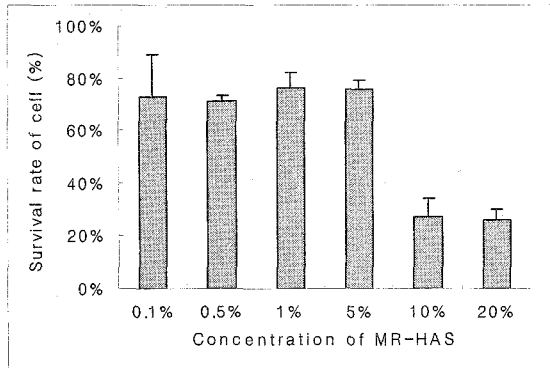


Fig. 2. The cytotoxicity of MR-HAS on mice lung fibroblasts

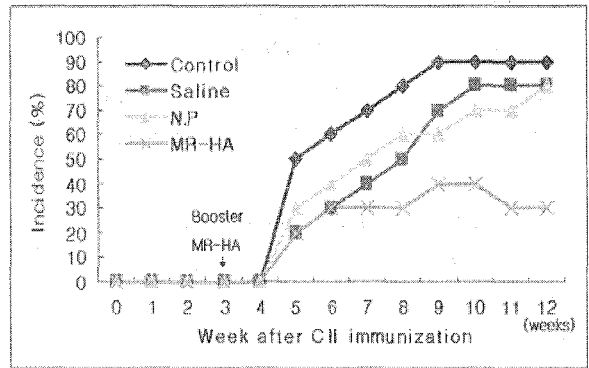


Fig. 3. Effects of MR-HA on the murine CIA incidence

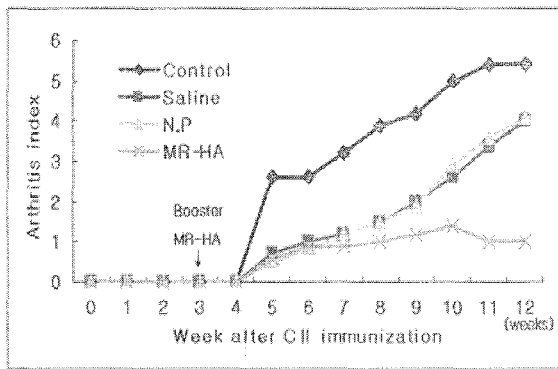


Fig. 4. Effects of MR-HA on the murine CIA arthritis index

1. In vitro

1) 細胞毒性 測定

細胞의 生存率은 藥鍼濃度의 增價에 따라 減少하여 桑枝藥鍼液 濃度 1%에서 가장 높은 生存率을 보였다(Fig. 2).

2. In vivo

1) 關節炎 發病率 分析

桑枝藥鍼群의 關節炎 發病率이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 3).

2) 關節炎 指標(AI)

關節炎 指標(AI)는 CII 1차 接種을 시점으로 12주 동안 관찰하였다. 桑枝藥鍼群의 關節炎 指標(AI)가 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 낮게 나타났다(Fig.4).

3) ELISA analysis

(1) IL-6 in serum

血清內 IL-6는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig.5).

(2) IFN- γ in serum

血清內 IFN- γ 는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 5).

(3) TNF- α in serum

血清 TNF- α 는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

(4) IgG in serum

血清內 IgG는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

(5) IgM in serum

血清內 IgM은 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

(6) IL-1 β in serum

血清內 IL-1 β 는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

(7) Anti-collagen II in serum

血清內 Anti-collagen II는 桑枝藥鍼群이 Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

(8) IFN- γ in CIA mouse spleen cell culture
CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IFN- γ 는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 5).

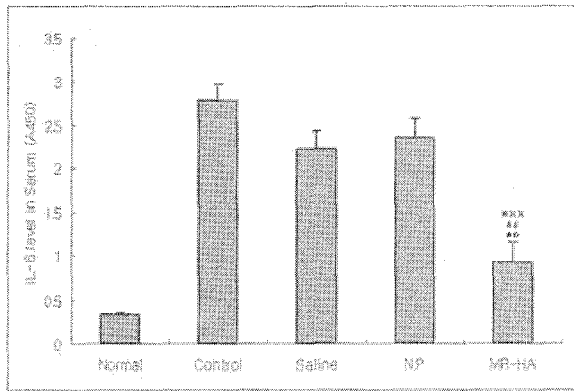
(9) IL-4 in CIA mouse spleen cell culture
CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에서 IL-4는 MR-HA群이 Control群 및 Saline群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 5).

(10) IL-10 in CIA mouse spleen cell culture
CIA mouse spleen cell culture supernatant 內에

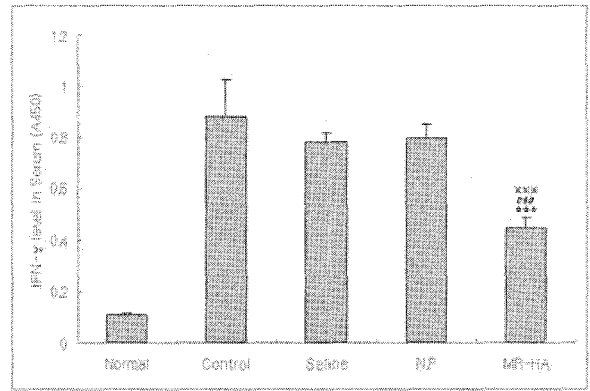
서 IL-10는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 약간의 減少를 보였으나 有意성은 없었다(Fig. 5).

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

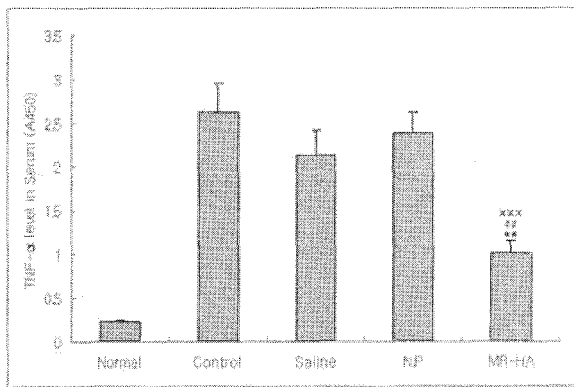
Normal spleen cell culture supernatant 에서는 IL-4가 IFN- γ 에 비해 현저히 높은 수준을 나타내었으나, Control群에서는 IFN- γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 桑枝藥鍼群에서는 IFN- γ 가 감소하여 IL-4와 비슷한 수준이 되었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다(Fig. 5).



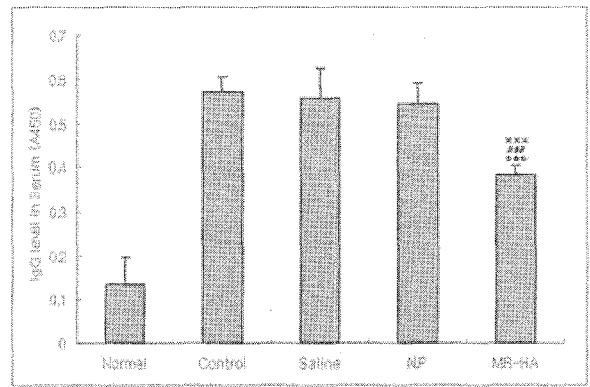
(A) The level of IL-6 in CIA mouse serum.



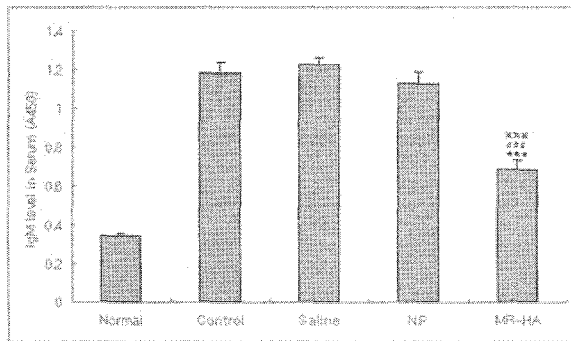
(B) The level of IFN- γ in CIA mouse serum.



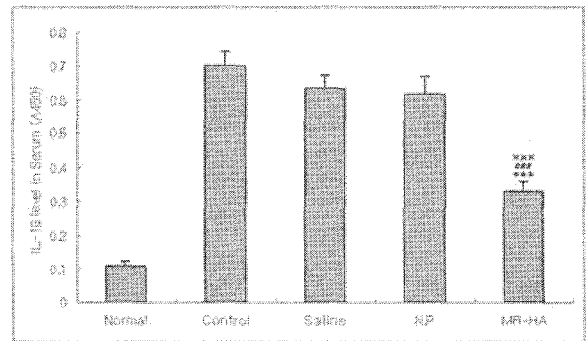
(C) The level of TNF- α in CIA mouse serum.



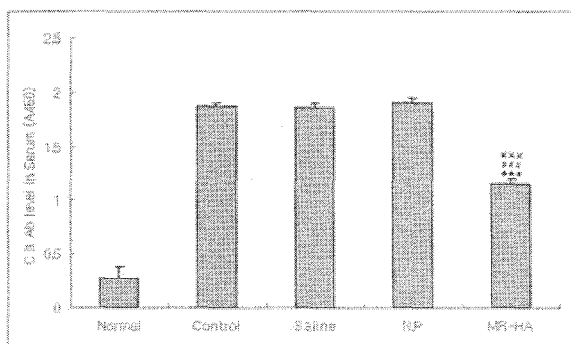
(D) The level of IgG in CIA mouse serum.



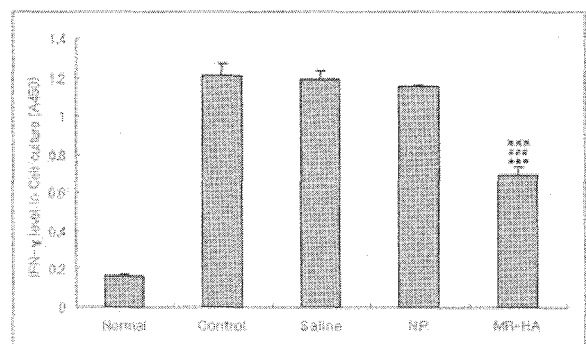
(E) The level of IgM in CIA mouse serum.



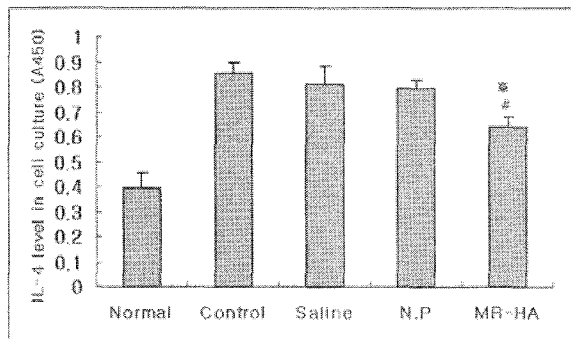
(F) The level of IL-1β in CIA mouse serum.



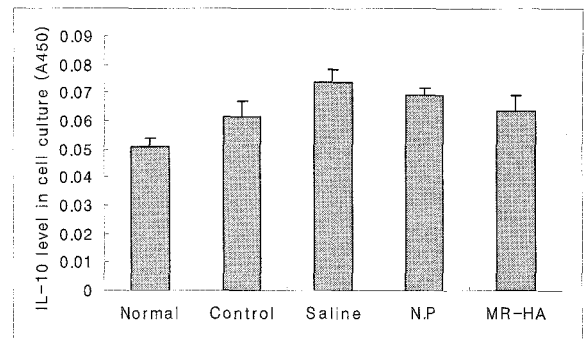
(G) The level of CII Ab in CIA mouse serum.



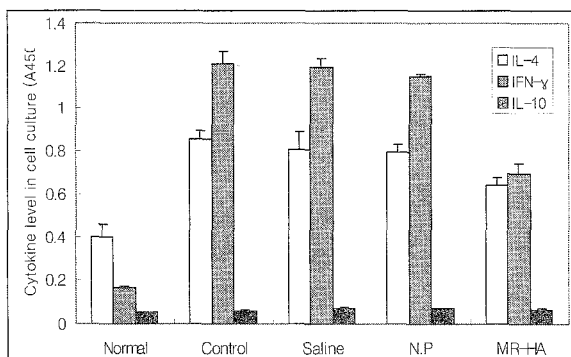
(H) The level of IFN-γ in CIA mouse spleen cell culture.



(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 mouse spleen cell culture.

Fig. 5. ELISA analysis

4) Histological analysis

(1) Hematoxylin and eosin stain

桑枝藥鍼群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되었다(Fig.6).

(2) Masson's trichrome stain

組織學的으로 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 collagen fiber가 正常에 가깝게 維持되었다(Fig.6).

5) Fluorescence-activated cell sorter analysis

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

淋巴節에서 T세포와 B세포의 비율을 알아보려고 CD3e⁺細胞와 CD19⁺細胞의 比率을 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群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. 7).

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

淋巴節에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보려고 CD4⁺細胞와 CD8⁺細胞의 比率을 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群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. 7).

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

關節내 활성화된 T세포수의 변화를 알아보려고 CD3e⁺/CD69⁺細胞의 比率을 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 7).

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

淋巴節내 활성화된 B세포수의 변화를 알아보기 위하여 CD11a⁺/CD19⁺細胞의 比率을 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 7).

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

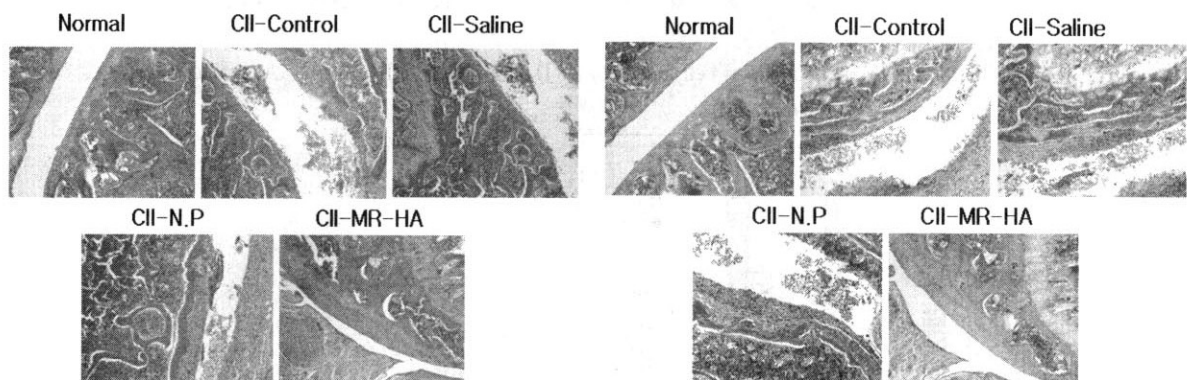
關節내 염증성 과립구수의 변화를 알아보기 위하여 CD11b⁺/Gr-1⁺細胞의 比率을 관찰한 결과 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 7).

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

脾臟細胞에서 CD4⁺/CD25⁺ 細胞는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 減少하였다(Fig. 7).

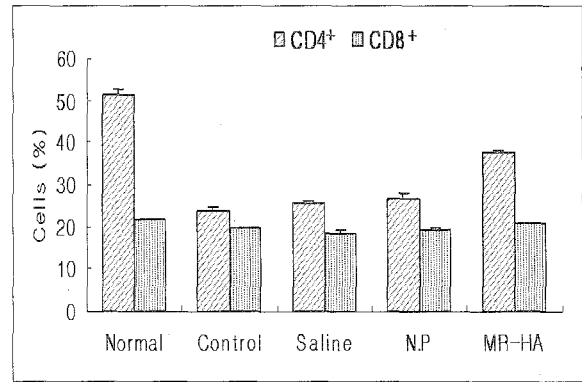
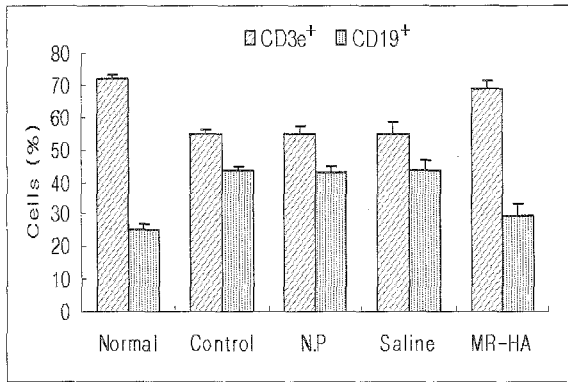
(7) CD4⁺/CD25⁻ cell percentage in lymph node

淋巴節에서 CD4⁺/CD25⁻ 細胞는 桑枝藥鍼群이 正常群과 類似한 比率을 維持하였다(Fig. 7).



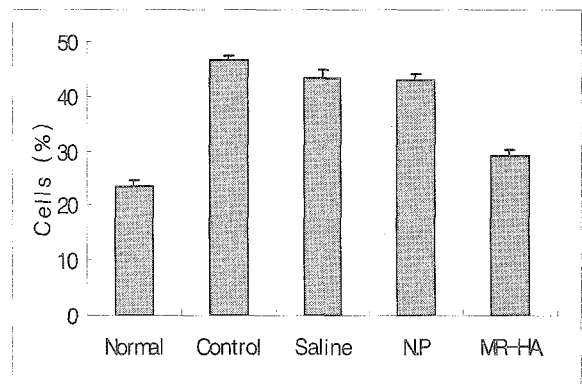
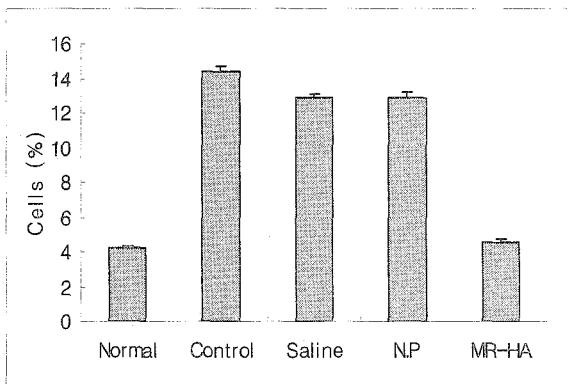
(A) Histological analysis of mouse joint section (HE stain). (B) Histological analysis of mouse joint section (MT stain).

Fig. 6. Histological analysis



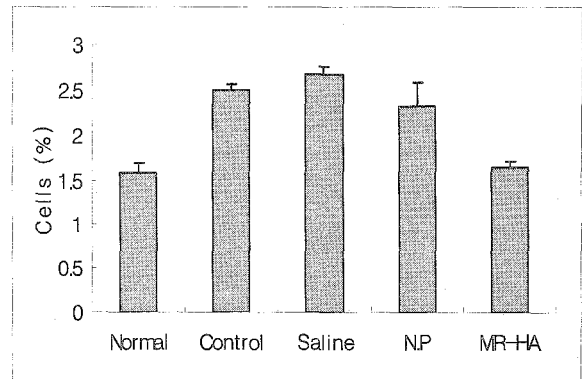
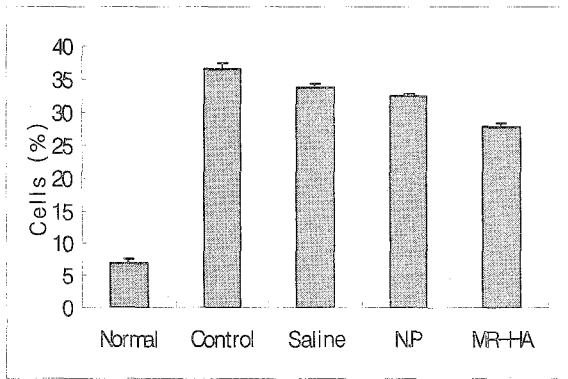
(A) Effects of MR-HA on expression of CD3e+/CD19+ in CIA mouse lymph node.

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



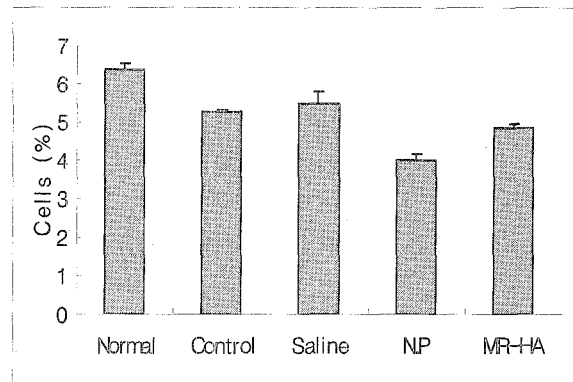
(C) Effects of MR-HA on expression of CD3e+/CD69+ in CIA mouse joint.

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



(E) Effects of MR-HA on expression of CD11b+/Gr-1+ in CIA mouse joint.

(F) Effects of MR-HA on expression of CD4+/CD25+ in CIA mouse lymph node.



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

Fig. 7. Fluorescence-activated cell sorter analysis

IV. 考 察

류마티스 關節炎은 여러 器官을 침범하는 가장 흔한 慢性的인 炎症性 疾患의 하나로, 대표적인 自家免疫性 疾患으로 생각되고 있다. 이는 多様な 全身症狀이 나타나기도 하나, 對稱的으로 末梢 關節을 侵犯하는 지속적인 炎症性 滑液膜炎이 特徴적으로 軟部組織, 특히 關節이나 腱의 滑液膜에 非細菌性 慢性 炎症 反應이 長期間 나타나면서 關節痛이나 腫脹이 惡化와 好轉을 反復하는 것을 特徴으로 하며⁵⁾, 病이 進行됨에 따라 全身적으로 衰弱해지면 상당한 例에서는 關節 外의 症狀, 즉 循環器系, 胃腸管系, 神經系 혹은 眼耳鼻咽喉科 領域에 關節症狀이 나타날 수도 있다⁵⁾.

류마티스 關節炎은 發病 後 2年 以內에 약 60-70%에서 骨糜爛이 發生하고 일단 關節의 破壞가 進行되면 이를 抑制시키기가 쉽지 않기 때문에 結局 病이 進行됨에 따라 運動 制限및 機能 消失이 따르게 되며, 이는 障礙를 誘發하여 個人은 물론 社會 經濟적으로도 심각한 損失을 招來한다⁵⁾.

그 直接的인 原因은 아직 糾明되지 않고 있으나, 假說的인 原因으로 連鎖상구균이나, virus 등의 感染 設, 비타민 결핍증, 호르몬의 不調와 免疫學的 反應 등이 거론되고 있는데, 이 중 주목받고 있는 것이 自家免疫說이며^{12,13)}, 약 30-40%의 遺傳的인 所因과 60-70%의 環境的인 要因들이 複合的으로 作用하여 發生할 것으로 推定하고 있다²⁷⁾. 免疫學에서 自

家抗體와 自家抗原의 相互作用으로 인한 反應들이 組織損傷을 일으키면 自家免疫性反應(autoimmune reaction)이라고 하며, 組織損傷이 臨床的 異常을 惹起시켜 나타나는 것을 自家免疫性疾患(autoimmune disease)이라고 부른다¹²⁾.

류마티스 關節炎은 일반적으로 關節의 炎症, 腫脹, 痛症, 機能喪失 등을 隨伴하며 慢性的으로 進行되어 滑膜組織의 過大 增殖과 뼈 및 軟骨의 破壞를 招來하는데 滑膜炎이 誘發되면 化學走性因子가 形成되고, 活性化된 滑膜細胞 表面에 細胞癒着分子 發現이 亢進되어 關節안으로 淋巴球과 單核球가 이동하고 MHC II 抗原分子와 淋巴球 活性에 關係하는 不分子들이 發現되어 浸潤된 T세포를 活性化시킨다. 活性化된 보조 T세포는 B세포를 刺戟하여 抗體를 生成하며 抗體의 一部가 자신의 IgG불변부위에 附着하여 免疫複合體를 形成한다. 자신의 IgG에 대하여 만들어진 自家抗體를 류마티스因子라 하며, 이들 免疫複合體는 보체를 活性化하여 炎症反應을 일으키고 炎症反應으로 모인 炎症細胞들은 리보솜 단백질분해효소, 프로스타글란딘, oxygen radicals를 분비하여 關節의 collagen과 軟骨을 損傷시킨다. 림프구활성인자 IL-1은 collagen分解酵素를 活性化하여 collagen의 破壞를 더욱 促進시킨다. 이와같이 RA의 病理的 機轉에는 免疫調節의 異常이 중심적 役割을 하는 것으로 밝혀져 있다¹⁴⁾.

臨床에서 류마티스 關節炎은 慢性 多發性 關節炎이 특징이며, 대략 2/3의 患者에서 滑膜炎이 나타날 때까지 疲勞, 食欲不振, 全身衰弱, 模糊한 筋肉

및 骨格 症勢 등이 시작된다. 이런 前驅症勢는 수 주 내지 수개월 지속되며 診斷을 어렵게 한다. 全身 症勢는 몇 개의 關節 특히 손, 손목, 무릎, 발의 關節로부터 漸次的으로 나타나고 對稱樣相을 갖는다. 약 10%의 患者에서 發病이 急性으로 나타나고 多發性關節炎이 빠르게 發展하며 열, 淋巴腺炎, 脾臟肥大 등의 全身症狀을 呼訴한다. 患者의 1/3은 하나의 關節 또는 적은 수의 關節에만 局限되어 나타날 수 있으며, 대부분의 患者는 對稱의 分布를 나타낸다. 炎症은 組織損傷에 대한 正常的인 防禦機轉으로서 正常的으로는 炎症誘發要因을 除去, 損傷된 組織의 治愈, 機能의 恢復을 가져오지만, 류마티오이드 關節炎과 같은 慢性疾患에서는 原因의 除去가 不可能하여 결국 계속되는 炎症으로 인하여 組織의 損傷에 따른 機能의 損失을 가져온다³⁾. 따라서 류마티오이드 關節炎의 치료목적은 炎症反應을 최소한으로 줄여 關節運動을 維持시키고 關節運動의 힘이 되는 筋力을 維持시키며 2차적으로 關節의 強直 및 變形을 防止하는데 있다⁵⁾.

西醫學的인 治療는 保存的治療, 藥物治療, 手術的治療로 나눌 수 있다. 保存的治療 즉 基礎療法은 적절한 營養供給과 安定, 休息, 誘發要因에 對한 處置, 物理治療 등을 實施하며, 藥物治療는 부신피질호르몬, 아스피린과 비스테로이드성 항염증제, 항류마티오이드제, 금(gold)요법 등을 사용하며 上記의 治療에도 불구하고 關節의 痛症, 關節의 腫脹, 拘縮, 신경증세가 出現하거나 進行되면 外科的 手術을 施行한다¹⁵⁾. 그러나 藥物治療에 있어 현재 사용중인 消炎鎮痛劑(NSAIDs)는 胃腸管이나 腎臟의 障礙를 招來하고, 부신피질호르몬제중 Glucocorticoid는 骨多孔症, 胃腸管障礙, 糖尿病, 高血壓, 感染, 의인성쿠싱증후군 등 다양한 合併症이 발생하며, 항류마티오이드제(DMARDs)는 藥劑에 따라 作用機轉과 副作用 및 期待되는 藥效의 迅速性 등이 서로 다르고 地域에 따라서도 選好하는 藥劑가 다르다¹⁶⁾.

최근 활발히 연구가 진행되고 있는 治療方法은 炎症誘發 cytokine의 拮抗物質을 이용하는 방법이다. 가장 많은 기대를 모으고 있는 약제는 Interleukin-1 수용체의 antagonist와 종양괴인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 길항물질로서 soluble TNF- α 수용체와 항 TNF- α 항체가 있다. 또한 遺傳子 治療가 많이 기대되고 있다¹⁷⁾.

關節炎 및 慢性 炎症性 痛症 疾患의 研究를 위한 동물실험 모델로 대표적인 것으로 adjuvant 誘發 關

節炎과 Collagen 誘發 關節炎이 있다. Type II collagen-induced arthritis(CIA)는 Trentham 등¹⁸⁾에 의해 1977년에 처음 발표된 이후로, 人體에서 自家免疫과 관련된 研究를 위해 널리 사용되어 지고 있다. 본 研究에서는 류마티오이드 關節炎과 관련된 慢性 炎症性 痛症에 대한 實驗 model로, 보다 류마티오이드 關節炎에 가까운 CIA Rat model 을 이용하였다.

류마티오이드 關節炎에 대한 韓醫學的 研究로 羅 등¹⁹⁾은 鍼治療를 위주로 患者의 상태에 따라 灸, 附缸, 藥物治療 등을 並行하여 유의한 治療效果를 觀察하였고, 黃²⁰⁾은 기존의 灸, 附缸 및 藥物治療에 熊膽牛黃麝香 藥鍼을 並行治療하여 關節의 炎症變化를 減少시켜 關節의 機能障礙를 防止하는 效果를, 黃等²¹⁾은 蜂藥鍼을 이용하여 臨床的 效果가 있음을 報告하였다. 最近에 RA에 대한 藥鍼 研究가 활발히 이루어지고 있는데, 秦芫, 草龍膽, 草烏 등의 藥鍼液이 adjuvant 關節炎에, 澤蘭, 赤芍藥, 木防己 등의 藥鍼液이 collagen 誘發 關節炎에 유효함이 報告되었다.

藥鍼療法은 鍼刺戟과 藥物을 결합시킨 新鍼療法으로서 이는 經絡學說에 의거하여 운용된 藥物을 有關穴位, 壓痛點, 혹은 體表에 觸診으로 나타나는 陽性反應點에 注入하므로써, 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 改變시켜 疾病을 治療하는 新鍼療法으로, 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 있다²²⁾.

본 實驗에서 選擇한 足三里(ST36)는 免疫機能을 強化시킬 수 있는 經穴²³⁾ 중 하나로 足陽明胃經에 屬하고 胃經의 合穴로 六腑下合穴이고 回陽九針穴, 四總穴, 中風七處穴 中的 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, 皮膚瘙癢症, 알레르기성 疾患, 臟氣虛態, 眞氣不足, 產後血暈 등의 疾患에 廣範圍하게 應用되고 있다²⁴⁾.

桑枝는 桑科에 속한 落葉喬木인 뽕나무의 嫩枝²⁵⁾로 本草圖經에 처음 收錄된 후 많은 本草書에 記載되어 왔다. 味는 苦하고 性은 平·無毒하며, 歸經은 李²⁶⁾와 辛²⁷⁾은 肺·腎 2經이라 하였고, 대부분의 本草書는 肝經이라 하였다. 桑枝는 清熱祛風濕通經絡, 利關節, 行水氣, 祛風養筋 등의 效能이 있어 痺痛, 筋疾患, 關節痛, 運動障礙, 四肢拘攣, 關節痠痛麻木 등의 治療에 應用된다⁷⁾. 陣²⁸⁾은 風濕關節痛에 祛濕發汗 止痛하는 效果를, 朴²⁹⁾ 등은 桑枝藥鍼의 鎮痛效果를 報告하였으나, 發散風寒, 祛風濕止痛하는 桑

枝藥鍼液에 대한 實驗 報告는 없었다.

이에 著者는 桑枝藥鍼液의 細胞毒性을 測定하고, collagen II 注入에 의하여 關節炎이 誘發된 생쥐의 足三里(ST36)43-45)에 桑枝藥鍼을 施術한 후, 關節炎 發病率, 각종 RA 관련 cytokine 및 immunoglobulin level, lymph node와 關節腔內 免疫細胞 표면분자 發現 등을 觀察하였다.

桑枝藥鍼液(MR-HAS)의 in vitro에서 細胞毒性 測定결과, MR-HAS 濃度 1%에서 가장 높은 細胞生存率을 보여(Fig. 2) MR-HAS 1%를 實驗에 使用하였다.

in vivo에서 실험시작 4주후 부터 關節炎이 發病하기 시작하였으나, 桑枝藥鍼群에서 Control群, Saline群 그리고 NP群에 비하여 關節炎 發病率이 낮게 나타났으며(Fig. 3), 關節炎 指標(AD)또한 Control群, Saline群 및 NP群에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 4).

류마티오이드 關節炎의 發生에 있어 세포성 면역반응은 주로 T림프구에 의하여 이루어지나, NK세포와 대식세포들에 의해 이루어지기도 하며, 이들 세포 간에는 cytokine들이 關與하는 것으로 알려져 있다.^{30,39)}

T림프구는 表面 marker와 作用의 차이에 의해 두 가지 아집단, 즉 림프구의 活性化를 促進하는 CD4⁺ Th림프구와 標的細胞를 破壞하는 CD8⁺ Tc림프구로 나누어지며 이들은 각각 MHC class II 항원, MHC class I 항원에 구속되어 항원을 識別하는 T세포 受用體를 가진다.^{30,39)}

Th림프구 중 Th1 세포는 IL-2, IFN- γ , lymphotoxin을 생산하고 Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10을 생산하며 IL-3, TNF- α 및 GM-CSF는 Th1 및 Th2 모두에서 생산되는 것으로 알려져 있다.¹⁾

活性化된 CD4⁺ T細胞는 單核球, 대식세포, 滑膜纖維細胞를 刺戟하여 IL-1, IL-6, TNF- α 를 生産하고 TNF- α 와 IL-6는 류마티오이드 關節炎에 있어서 關節의 炎症에 作用하며, 滑膜細胞들을 活性化시켜 增殖하게 한다.³¹⁾ 炎症이 있는 滑膜에서 滑膜細胞들의 表面層과 下部層은 다른 cytokine들을 生産한다. 關節腔과 인접한 滑膜細胞의 表面層에서는 주로 IL-1 과 TNF- α 를 生産하고, 반면에 흠어져 있는 下部의 滑膜細胞에서는 IL-6를 生産한다. IL-1과 TNF- α 는 IL-6의 分泌를 促進시키고, IL-6는 subsynovial stromal 細胞와 대식세포에서 生産된다. 따라서 軟骨과 骨의 破壞는 대개 軟骨, 骨, 滑膜 連接部의 侵蝕에 의해 發生하며, IL-1, TNF- α 등의 炎症誘發 cytokine에 반응한 대식세포나 stromal 細胞에 의해 生産되는 MMPs

(주로 collagenase인 MMP-1, stromelysin인 MMP-3)에 의해 extracellular matrix가 破壞된다. Matrix Metalloprotease (MMP), 특히 stromelysin(MMP-3)과 collagenase (MMP-1)은 結合組織의 基質을 破壞시키며, 류마티오이드 關節炎에서 關節損傷의 주된 媒介體로 생각되는 enzyme 이다. 또한 活性化된 CD4⁺ T細胞는 osteoclastogenesis를 刺戟하여, IL-1, TNF- α 와 독립적으로 關節損傷을 일으킨다.³¹⁾

IL-6는 活性化된 T세포, 대식세포, 단핵구, 혈관 내피세포, 섬유아세포들이 분비하는 cytokine으로 B세포 分化過程에 關與하는 중요한 成長因子³⁹⁾로 作用한다. IL-1과 TNF- α 에 의해 分泌가 促進되는 급성 조절 단백질로서 류마티오이드 關節炎의 炎症反應에 주된 媒介 作用으로 혈청 및 關節炎의 損傷된 關節의 關節液에서 活性도가 增加하며, 骨關節炎보다 높은 活性도를 보여 류마티오이드 關節炎의 活性도와 關聯성이 있다.³²⁾

Interferon(IFN)에는 α , β , γ 의 3종류가 있는데 IFN- α 는 백혈구에서 생성되고, IFN- β 는 바이러스 感染 섬유아세포에서 生成되며, IFN- γ 는 活性化된 T림프구에서 生成된다.

3종류의 IFN에 공통으로 나타나는 活性은 바이러스 感染의 阻止, 細胞增殖의 抑制, NK세포, Tc세포, B세포의 活性化, MHC 항원發現의 促進 등인데, 免疫係에서 가장 강하게 作用하는 것은 IFN- γ 이며^{12,33)}, IFN- γ 는 CD4⁺T細胞와 CD8⁺T細胞에서 抗原刺戟과 동시에 轉寫되어 IL-2 刺戟으로 더욱 亢進되어 生成되고, NK細胞에서도 소량 生成된다. 원래 세포표면에 없는 MHC 제이항원분자를 細胞表面에 發現하도록 亢進시키며, 細胞毒性 T細胞의 標的細胞破壞는 물론, CD4⁺T細胞의 抗原認知反應을 效率적으로 亢進시킬 수 있다. 그리고 대식세포와 多核食細胞가 가지고 있는 IgG 抗體의 Fc부분에 대한 受用體(FcR)發現을 誘導하여 옴소닌(opsonization) 作用을 한다.³⁹⁾

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 대표적인 炎症誘發 cytokine이며 류마티오이드 關節炎에서 TNF- α 는 대식세포에서 分泌되며, T세포 섬유세포에서도 生産되어 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고 호중구, 림프구, 단핵구의 化學遊走 및 섬유모세포증식 활막섬유모세포와 연골세포에 作用해서 PGE2와 collagenase 生産을 促進한다¹²⁾. TNF- α 를 阻害하면 IL-1, IL-6와 GM-CSF를 抑制하며³⁹⁾ 최근 Feldman³⁴⁾ 등은 사람 TNF에 대한 monoclonal항체를 關節炎 患者의 정맥

내로 注射한 결과, 關節 浮腫과 혈청 C-reactive 단백질의 수준이 극적으로 改善되는 것을 볼 수 있었다고 報告한 바가 있다.

IL-1은 단핵구, 대식세포, B세포, 활성화된 T세포에서 생성되고, IL-1 α , IL-1 β 의 두 가지 形態가 있으며¹¹⁾ IL-1 β 는 류마티드 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 癒着性を 增加시키고, 섬유모세포, 활막세포 및 연골세포에서 PGE2와 collagenase 生産을 促進하여 關節軟骨의 破壞와 骨의 再吸收를 招來한다¹²⁾.

본 實驗에서 혈청 내 IL-6, IFN- γ , TNF- α , 및 IL-1 β 를 조사한 결과, 모두 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였다(Fig. 5).

류마티드 關節炎 患者의 B림프구는 혈청이나 關節 내에서 자가항체인 IgG, IgM, IgA를 分泌하며 이 항체가 다시 항원으로 작용하여 면역글로블린의 Fc부위에 대한 자가항체인 류마티드 인자(rheumatoid factor, RF)를 생성한다. 일단 IgG와 RF가 항원-항체 複合물을 形成하면 보체를 活性化시키는 화학 매개물이 放出되고 활막세포 및 호중구는 lysosome 효소를 放出하여 활막세포 破壞와 炎症反應을 일으킨다. 특히 IgG-RF와 IgM-RF는 동일한 개체 내에서 류마티드 關節炎의 活動성과 有關한 指標가 되며, 이 중 IgM-RF는 류마티드 關節炎환자의 2/3에서 양성으로 나타나며, 測定이 용이하여 臨床에서 주로 이용된다³⁵⁾.

血清內 IgG과 IgM은 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

關節炎 發生初期에는 B림프구가 관계하는 체액성 면역반응이 보다 중요한 역할을 하는데, B림프구의 表面에서 放出되는 IgG anti-collagen 항체는 제 II형 collagen에 대한 특이반응을 보인다. 이 항체가 增加하는 경우 關節炎이 발생하며, 일반적으로 항체 정도와 關節炎의 심한 정도는 관련이 있어 이를 측정하여 關節炎의 객관적 지표로 이용하고 있다.

血清內 Anti-collagen II는 桑枝藥鍼群이 Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性있게 減少하였다(Fig. 5).

IL-4는 IgE 항체의 生成과 未感作 CD4⁺ T세포로

부터 Th2세포 발생을 위한 주요 자극제로써, IFN- γ 의 활성화효과를 拮抗해서 세포매개 면역반응을 阻害한다³³⁾.

IL-10은 면역실행세포의 作用과 炎症反應을 抑制하는 廣範圍한 免疫調節 cytokine이다. IL-10은 活性化된 대식세포와 수지상세포가 IL-12와 TNF를 生成하는 것을 妨害한다. IL-12는 IFN- γ 分泌의 결정적인 刺戟劑이고, 세포내 細菌에 대한 先天免疫과 適應免疫의 誘導物質이기 때문에 IL-10은 그런 모든 反應을 下向 調節한다. 또한 IL-10은 대식세포 표면의 동시자극자(costimulator)와 class II MHC 분자의 發現을 妨害한다. 이 작용 때문에 IL-10은 T세포의 活性化를 阻害하고, 細胞媒介 免疫反應을 終結시키는 作用을 한다³³⁾.

CIA mouse spleen cell culture supernatant 내에서 IFN- γ , IL-4는 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 有意性 있게 減少하였고(Fig. 5), IL-10은 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 약간의 減少를 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5). IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10의 비율에서 Normal spleen cell culture supernatant 에서는 IL-4가 IFN- γ 에 비해 현저히 높은 수준을 나타내었으나, Control群에서는 IFN- γ level이 IL-4 level보다 높게 나타났다. 桑枝藥鍼群에서는 IFN- γ 가 감소하여 IL-4와 비슷한 수준이 되었다. IL-10은 모든 실험군에서 유의한 변화가 없었다(Fig. 5). 따라서 足三里 桑枝藥鍼이 免疫反應 調節에 유의한 作用을 하였음을 알 수 있었다.

관절 組織의 構造를 觀察하기 위하여 Hematoxylin and eosin stain 染色法으로 關節 組織을 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群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되었다(Fig. 6).

교원섬유(collagen fiber)의 축적 정도를 알아보기 위해 실시한 Masson's Trichrome stain 染色法으로 관찰한 결과, 組織學的으로 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 비하여 collagen fiber가 正常에 가깝게 維持되었다(Fig. 6).

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 표면에 表現되는 表式因子로 CD3⁺가 있다. 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다³⁰⁾.

CD3e 세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 關聯되어 있으며 항원인식 信號를 세포 안으로 傳達하는 機能을 하고, CD19는 B세포에 있고 B세포 리셉터의 협조자(co-B cell Receptor)로서 CD21과 複合體를 이루어 信號 形質流入의 役割을 하고, B세포의 發達 初期段階에서부터 프라즈마 細胞의 最終 分化 段階까지 發現된다³⁶⁾.

淋巴節에서 T세포와 B세포의 비율을 알아보고자 CD3e⁺細胞와 CD19⁺細胞의 比率를 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 正常群과 類似한 比率를 維持하였다(Fig. 7).

淋巴節에서 보조 T세포와 억제 및 세포독성 T세포의 비율을 알아보고자 CD4⁺細胞와 CD8⁺細胞의 比率를 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 正常群과 類似한 比率를 維持하였다(Fig. 7).

CD3e세포는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 關聯되어 있으며, CD69는 休止期 淋巴球에서는 發現되지 않지만, T세포가 活性化되면 2시간 이내에 發現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된다. T세포와 내피세포 간의 相互作用에 있어서 T세포를 活性化시키는데 CD69같은 多様な 表面表示因子들의 發現이 增加된다³⁶⁾.

關節내 활성화된 T세포수의 變化를 알아보고자 CD3e⁺/CD69⁺세포의 比率를 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 減少하였다(Fig. 7).

CD11a는 백혈구에서 發現되고, CD18과 짝을 이루며 附着과 細胞의 移動作用을 하며, CD19 세포는 B세포의 수를 測定하는데 주로 使用하며, 항체를 직접 生産하여 外部物質을 中和시키는 體液性 免疫反應에 關與한다³⁶⁾.

淋巴節내 活性化된 B세포수의 變化를 알아보기 위하여 CD11a⁺/CD19⁺세포의 比率를 관찰한 결과, 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 顯著하게 減少하였다(Fig. 7).

CD11b는 단핵세포, 과립구, NK세포에서 發現되는 세포표면분자로서, 이 細胞들은 炎症時에 제일 먼저 도착하는 血球들로 身體에 침투한 抗原에 대한 貪食作用이 기본 기능이다³⁷⁾. 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 있다³⁸⁾. Gr-1의 강한 陽性反應을 보이는 細胞들은 顆粒白血

球들이다³⁷⁾.

關節내 염증성 과립구수의 變化를 알아보기 위하여 CD11b⁺/Gr-1⁺세포의 比率를 관찰한 결과 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 減少하였다(Fig. 7).

CD4는 보조 T세포(helper T cell)에, CD25는 활성화된 T세포, 대식세포, B세포에 發現하는데, 면역 조절세포인 regulatory T세포를 알아보기 위한 CD4⁺/CD25⁺ 세포 比率를 관찰한 결과 脾臟細胞에서 桑枝藥鍼群이 Control群, Saline群 및 N.P群에 比하여 減少하였고(Fig. 7), 淋巴節에도 桑枝藥鍼群이 正常群과 類似한 比率를 維持하였다(Fig. 7).

以上을 綜合하여 볼 때 桑枝藥鍼은 免疫反應抑制 및 調節效果로 류마토이드 關節炎 抑制에 有效한 作用이 있는 것으로 나타났고, 향후 臨床의 活用을 위한 持續的 研究가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

DBA/1J mouse를 대상으로 桑枝藥鍼이 Collagen-induced arthritis에 미치는 影響을 觀察한 결과, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 關節炎 發病率과 關節炎 指標(AI)
 - 1) 桑枝藥鍼群에서 關節炎 發病率이 현저하게 낮았다.
 - 2) 桑枝藥鍼群에서 關節炎 指標(AI)가 Control群에 比하여 낮았다.
2. 桑枝藥鍼이 각종 cytokine, 면역 글로불린 및 Anti-collagen II에 미치는 影響
 - 1) 血清내 IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 는 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 有意性있게 減少하였다.
 - 2) 血清내 IgG, IgM은 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 有意性있게 減少하였다.
 - 3) Anti-collagen II는 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 有意性있게 減少하였다.
 - 4) 脾臟細胞培養에서 IFN- γ , IL-4, IFN- γ /IL-4의 比率는 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 有意性있게 減少하였으며 IL-10은 유의한 차이

가 없었다.

3. 桑枝藥鍼이 關節의 組織學的 變化에 미치는 影響
 - 1) Hematoxylin and eosin stain에서 桑枝藥鍼群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 桑枝藥鍼群의 胶原질침윤가 正常群과 같이 維持되었다.
4. 桑枝藥鍼이 免疫細胞의 發現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 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 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-1⁺ 細胞는 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 減少하였다.
 - 3) 脾臟細胞에서 CD4⁺/CD25⁺ 細胞는 桑枝藥鍼群에서 Control群에 比하여 減少하였고 淋巴節에서 CD4⁺/CD25⁺ 細胞는 正常群과 類似한 비율을 유지하였다.

以上の 結果로 足三里 桑枝藥鍼은 Collagen-induced arthritis에 有效한 것으로 나타났으며 關節炎 치료에 있어 向後 持續的인 研究와 臨床的 應用이 필요하리라 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 해리슨 번역편찬위원회. 內科學(II). 서울 : 정담. 1997 : 1666, 1992, 1777-85.
2. 권재상. 비중. 서울 : 정담. 1993 : 207-70.
3. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학. 서울 : 군자출판사. 1996 : 1262-4, 1266.
4. 吳永仙, 吳旼錫, 宋泰元. 류마티스 關節炎의 韓·羊方의 藥物治療의 最新傾向 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2002 ; 11(1) : 217-35.
5. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 2000 : 123-31, 175-89.
6. 원보권. 類風濕性關節炎中醫藥治療與研究進展. 서울 : 大韓鍼灸學會誌. 1998 ; 15(1) : 65.
7. 玉浴生. 中藥藥理與應用. 北京. 人民衛生出版社. 1983 : 925-6.
8. 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 ; Jun ; 23(6) : 355-7.
9. 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. Epub 2005 Jun 23.
10. 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. Epub 2005 May 20.
11. Pongchairerk U, Guan JL, Leardkamolkam V. Focal adhesion kinase and Src phosphorylations in HGF-induced proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line, HuCCA-1. World J Gastroenterol. 2005 Oct 7 ; 11(37) : 5845-52.
12. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1982 : 1-25, 229-46.
13. 박원. 류마티스 관절염의 정의와 원인. 의약정보. 1993 : 19(3) : 29-33.
14. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman : Cellular and Molecular Immunology. 서울 : 범문사. 2004 : 185, 423.
15. 박성환. 류마티스關節炎의 약물치료. 서울 : 대한의사협회지. 1996 ; 39(10) : 1272-4.
16. 박용범 외. 류마티스 關節炎의 약물요법. 서울 : 대한의사협회지. 1998 ; 43(4) : 370-5.
17. Marc Feldmann : Role of cytokines in Rheumatoid Arthritis, London, Annu.Rev.Immunol. 1996 ; 14 : 425.
18. Trentham DE. et al. : Autoimmunity to type II collagen : an experimental model of arthritis, J. Exp. Med. 1977 ; 146 : 857-68.

19. 羅昌洙 外. 류마티스성 關節炎에 관한 臨床的 考察. 서울 : 大韓韓醫學會誌. 1994 ; 14(2) : 205-15.
20. 황우준. 류마티스성 관절염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 1995 ; 12(1) : 281-90.
21. 황유진 外. 봉약침을 이용한 류마티스관절염의 임상적 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18(5) : 33-42.
22. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용(2). 대한약침학회. 1997 ; 1-5.
23. 서범석. 免疫과 관련된 腧穴 考察. 대전대 논문집. 1994 ; 2(2) : 133-61.
24. 全國韓醫科大學鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上,下). 서울 : 集文堂. 1988 : 214-7, 389, 489, 490, 730-32, 1408-9, 1457.
25. 傳統醫學研究所. 本草藥材圖鑑. 서울 : 成輔社. 1994 : 217.
26. 李尙仁 外. 本草學. 서울 : 永林社, 1991 : 439-40.
27. 辛民敎. 臨床本草學. 서울 : 남산당. 1986 : 672.
28. 陳在仁. 圖說韓方醫藥大辭典. 서울 : 東都文化社. 1984 : 348-51.
29. 朴文鉉. 桑枝藥鍼이 疼痛誘發 環維의 病理的 所見 및 血漿 β -endorphin含量에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1989 ; 6(1) : 159-75.
30. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학 강의. 대구 : 경북대학교출판부. 1996 : 193-235.
31. Franklin H. Epstein. Cytokine pathways and joint inflammation in RA, N. Eng. J. Med. 2001 ; 344(12) : 907.
32. 강재성 외. 세포분자면역학 5판. 서울 : 범문사. 2004 : 243-53, 261-9, 423.
33. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 1997 : 63, 118, 120-8, 175-87.
34. Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease ; analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease, Transplant Proc. 1998 ; 30(8) : 4126-8.
35. 이규범. 임상병리 핸드북. 서울 : 고문사. 1995 : 233-5.
36. Robert R. Rich et al. Clinical immunology. New York : Mosby. 2001 ; 4 : 13, 6 : 18.
37. Mosby international Ltd, Crash Couse. Immune blood and Lymphatic Systems. 서울 : 한우리. 2000 : 17-21.
38. Johnson BA. et al. Adhesion molecule expression in human synovial tissue, Arthritis Rheum. 1993 ; 36(2) : 137-46.
39. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 18, 134, 148-50.