

원저

紫何車藥針의 亢炎症能이 LPS 유발 關節炎 治療에 미치는 影響

박기범 · 백승태 · 이승덕 · 김경호 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Homnis Placenta Herbal Acupuncture on Reducing Expression of LPS-induced Arthritis Model as an Anti-inflammatory Agent

Park Ki-bum, Baek Seung-tae, Lee Seung-deok, Kim Kyung-ho and Kim Kap-sung

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine Dongguk University

Objectives : Rheumatoid arthritis(RA) is a systemic & a chronic inflammatory autoimmune disease . A chronic , locally destructive inflammatory reaction in human is exemplified by the synovitis present in some connective tissue disorder. The presence of a number of cytokines, TNF- α , iNOS & expression of nitric oxide, NF- κ B p65 activation implies an important role of cellular immune response in RA inflammatory reaction. This study was designed to evaluate on the effects of the Homnis Placenta herbal acupuncture on EX-LE201 & ST 35 reducing expression of LPS-induced arthritis model in mice.

Materials and Methods : Homnis Placenta herbal acupuncture was inserted into 10 rats induced rheumatoid arthritis. The acuapunctures were injected into the EX-LE201 and ST35 points. Such indexes were measured the inhibition of inducible nitric oxide synthase(iNOS) expression, nitric oxide(NO) production in vitro experiment and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) & Nuclear Factor kappa B(NF- κ B) p65 activation, synovial hyperplasia, angiogenesis and fibrosis in synovial membrane of knee joint of mice in vivo experiment.

Results : 1.Homnis Placenta Herbal acupuncture inhibited iNOS mRNA and NO in RAW 264.7 cell of LPS-induced rheumatoid arthritis in a dose dependent manner. 2.Homnis Placenta Herbal acupuncture also showed significant inhibition of TNF- α & NF- κ B p65, activation, synovial hyperplasia, angiogenesis and fibrosis in synovial membrane of knee joint of mice.

Conclusion : These results suggest that Homnis Placenta Herbal acupuncture has an therapeutic effects on LPS induced-rheumatoid arthritis by inhibiting TNF- α activation.

Key words : rheumatoid arthritis, Homnis Placenta Herbal acupuncture, iNOS, TNF- α , NF- κ B

I. 緒 論

대표적인 자가면역성 질환인 류마티스 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로 연골과 골파괴로 인해 관절의 파괴와 변형을 초래한다. 인구의 약 1-2%에서 이환되며 주로 30-50대의 여성에서 호발하는 질환으로 여자에서 약 2-4배 많다. 류마티스성 관절염의 직접적인 원인은 아직 규명되지 않고 있으며, 발병기전 및 병태생리도 여러 갈래로 연구되고 있다. 그러므로 류마티스 관절염의 예방법이나 관절염이 발병하였을 때 궁극적으로 관절염을 근절시키는 획기적인 방법은 아직 없으며, 현재까지의 기존치료는 약물치료, 외과적 치료, 재활 및 물리 요법으로 크게 나눌 수 있다¹⁾.

한의학에서 關節炎을 風, 寒, 濕, 熱등의 外邪가 인체에 침입하여 經絡의 소통에 장애를 주고, 氣血의 운행을 不暢하게 하여 근육, 근골, 관절 등의 부위가 시큰거리는 통증, 마비감, 관절의 기능 활동이 부자유스러움과 무거움 등의 증상을 나타낸다고 보고 있으며 심해지면 관절이 붓고 熱이 나는 등의 주요 임상증상을 보인다고 보고 있다²⁾.

이와 같은 증후를 痺症과 관련한 내용에서 찾아볼 수 있는데, 《素問 痺論》³⁾에 “所謂痺者, 各以其時, 重感於風寒濕之氣也” “風寒濕三氣 雜至合而爲痺也. 其風氣勝者爲行痺. 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲着痺也” 라고 하여 痺症에 대한 원인과 증후를 기록하고 있다. 또 《金匱要略 中風歷節病》⁴⁾에서는 “歷節之痛由汗出入水 當風所致” 또 歷節, 歷節風이라고도 하는데 이는 관절이 별경게 붓고 통증이 극렬하여 꺾거나 굽히기 어려운 것이 특징이다. 대개는 肝腎이 부

족한데 風寒濕을 받아 이것이 다시 관절에 침입하여 오랫동안 머물면서 열로 변하여 氣血을 울체시켜 나타난다. 이러한 임상증상으로 볼 때 류마티스 관절염은 한의학적으로 보아 痺나 歷節風으로 볼 수 있다.

최근의 보고에서는 도 등⁵⁾은 LPS로 유발된 류마티스 관절염에 유백괴, 계지, 우슬, O.K. 및 해독 약침을 주입하여 유의한 효과를 보고 하였고, 안 등⁶⁾은 녹용약침액이 자가항원제시형 Cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염에 미치는 효과를 보고 하였으며, 정 등⁷⁾은 사향, 우황, 응담의 복합제제 약침이 류마티스관절염유발 쥐의 혈액학적 변화 및 Collagen 분포변화를 통해 유의한 치료효과를 보고 하였고, 이 등⁸⁾은 봉독약침이 류마티스 관절염 환자의 관절 통증, 종창 및 급성염증반응에 미치는 영향을 연구하여 유의한 치료효과를 보고 하였고 남 등⁹⁾은 소풍활혈탕을 이용하여 歷節風에 대한 유의한 치료효과를 보고하였다.

이에 저자는 紫何車 약침의 류마티스 관절염에 대한 치료효과를 확인하기 위해 류마티스 관절염을 유발한 생쥐에 紫何車 약침을 內膝眼(EX-LE201)과 犢鼻(ST35)에 상응하는 생쥐의 무릎부위에 시술한 후 윤활관절막의 일반적인 형태변화, 혈관분포, 섬유화, TNF- α , NF- κ B p65, 염증성 효소 iNOS 변화를 조사하여 유의성 있는 효과를 얻었기에 이에 보고 하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 대식세포(macrophage)인 RAW264.7 세포는 Korean Cell Line Bank(KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO² incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어 주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다.

2) 동물

태령 4주된 BALB/c계 암컷 생쥐(대한실험동물센터, 서울)를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 아무런 처치를 하지 않은 정상군, 류마티스성 관절염을 유발시킨 대조군(RA군), 류마티스성 관절염 유발 후 紫河車藥針 처치를 한 실험군(JA군)으로 각각 분류

하였으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

3) 약침액

紫河車 약침은 GMP 기준에 따른 설비가 되어 있는 대한약침학회 실험실에서 다음과 같은 공정을 통하여 조제하였다.

4) 약침기

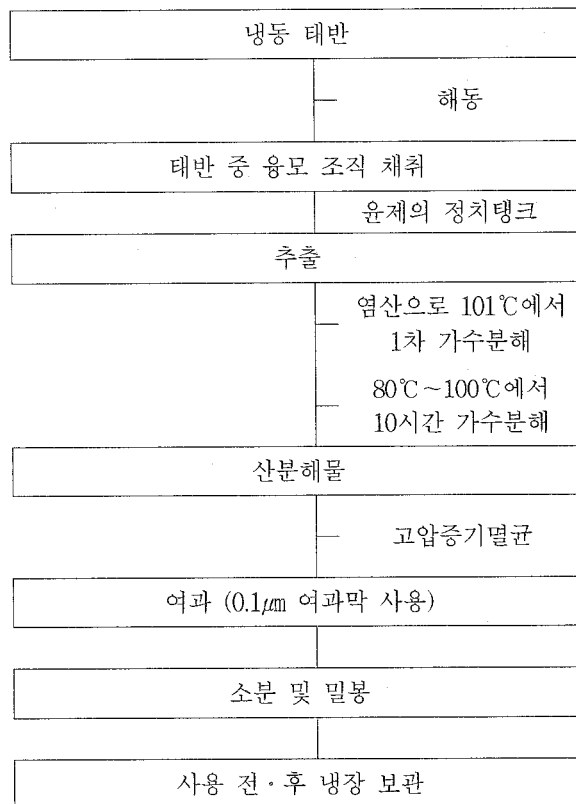
Hemiltonesyringe(Hewlett-Packard USA)를 사용하였다.

2. 실험 방법

1) In vitro 실험을 통한 자하거약침액의 iNOS 유전자 발현 변화 조사

(1) iNOS 유전자 발현

자하거약침액이 inflammatory cytokine인 inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법



Scheme 1. 자하거 약침액 조제의 과정

Table 1. The Primer of iNOS and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product(bp)	No. of cycles
iNOS*	sense	5'-AGACTGGATTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense	5'-AGAAGTGGAGGGTACATGCTGGAGCC-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

*: inducible nitric oxide synthase.

(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 cell - 5×10^5 cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(LPS; Final 1 μ g/ml)를 2시간 처리하여 iNOS mRNA 발현을 유도하였다. 자하거약침액을 10배, 100배 희석한 후 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 수거하여 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, iNOS primer를 PCR machine으로 반응시켰다 (Table I). PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

(2) Nitrite assay

Nitrite assay를 통해 NO 생성량을 측정하였는데, 위와 동일방법으로 배양·자극 상층액을 모아 Greiss reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 25% phosphoric acid) 50 μ l을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로는 아질산나트륨 (NaNO₂)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고 대상시료 처리에 의한 대식세포의 질소 산화물 (nitric oxide, NO₂) 생성을 산출하였다.

2) In vivo 실험을 통한 자하거 약침의 RA 치료 효과 조사

(1) 실험동물의 RA 유발

RA 유발을 위해 lipopolysaccharide(LPS; Sigma, USA)를 증류수에 희석한 후 각각 300 μ g/kg씩 무릎관절에 주사하였다. 특히 무릎관절낭으로의 정확한

주사를 위해 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 다음 무릎부위 피부를 절개하여 무릎뼈를 확인한 후 주사하였다. 한편 무릎관절에서의 RA 유발여부는 LPS 주사 후 24-48시간 동안 무릎주변에서 나타나는 부종의 확인을 통해 이루어졌다.

(2) 자하거약침의 시술

RA 유발 제3일부터 제21일까지 총 19일간 자하거약침 50 μ l/kg을 內膝眼(EX-LE201), 犢鼻(ST35)에 하루씩 번갈아가며 반복적으로 시술하였다.

(3) 윤활관절 표본 제작

RA 유발 제 21일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(4) 조직화학

① 윤활관절막내 혈관 분포 변화 조사

윤활관절막의 자유면 기저부에서 모세혈관의 분포 변화를 조사하기 위해서 심장관류고정없이 적출하여 제작된 무릎관절 표본을 Wright's stain solution에 30분간 반응 후 관찰하였다.

② 윤활관절막내 섬유화 조사

윤활관절막내 collagen섬유의 분포 변화 관찰은 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 통해 이루어졌다. 우선 무릎관절 표본은 우선 Weigert's iron hematoxylin에서 20분동안 핵 염색한 다음 Van

Gieson's 염색용액에서 5분간 콜라겐섬유에 대한 염색을 실시하였다.

(5) 면역조직화학

초기 pro-inflammatory cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)- α , inflammatory cytokine인 iNOS와 그의 전사인자 nuclear factor kappa B(NF- κ B) p65의 윤활관절막내 분포변화를 조사하기위해 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 무릎관절 표본을 우선 proteinase K로 proteolysis한 다음 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체 (1:100, Santacruz, USA)에 4°C humidified chamber에서 5일 동안 반응시켰으며, 2차항체(1:100, Santacruz)에 3일 동안 link 하였다. Avidin biotin complex(ABC) kit (DAKO)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 영상분석과 통계처리

Cytokine 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 SPSS 8.0을 통한 ANOVA test로 유의성을 검증하였다.

III. 結 果

1. 紫何車 약침의 윤활관절막내 조직 손상 완화 효과

1) 일반적인 형태 변화

류마티스성 관절염 유발 후 윤활관절막의 자유면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가, 많은 돌기(filopodia)를 가진 윤활세포의 출현 증가로 인한 거친 자유면 표면, 그리고 자유면쪽으로 림프구 침윤이 관찰되었다. 그러나

JA군은 RA군에서 나타난 형태변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 RA군에 비해 JA군은 윤활관절막의 자유면 두께 증가가 적었다. 윤활강쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소한 것으로 관찰되어, 자유면이 매끄러운 표면상태로 나타났다. 또한 윤활관절막 자유면으로의 림프구 침윤 증가도 RA군보다는 적었다(Fig. 1-A).

2) 윤활관절막내 혈관 분포 감소

대조군의 윤활관절막내 지방조직사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 류마티스성 관절염 유발 후 증가되는 양상을 보였는데, 특히 윤활관절막의 자유면 기저부에서 직경이 큰 모세혈관전세동맥(pre-capillary arteriole)과 모세혈관후세정맥(postcapillary venule) 출현이 증가하였다. 그러나 JA군에서는 일부 윤활관절막의 일부 자유면에서 모세혈관의 출현 증가가 관찰되었을 뿐, 그외 지역에서는 대조군과 유사한 분포 양상으로 나타났다(Fig. 1-B).

3) 윤활관절막내 섬유화 감소

류마티스성 관절염 유발 후 섬유화(fibrosis)와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적이 증가하였다. 섬유화의 양상은 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 섬유화가 관찰되었다. 이런 섬유화부위에서는 세포가장자리가 잘 발달된 섬유모세포 침적이 증가된 것으로 관찰되었다. 그러나 JA군의 윤활관절막에서 관찰된 결과는 RA군과는 많은 차이를 보였는데, 우선 RA군에 비해 낮은 섬유화가 일어났다. RA군의 윤활관절막 대부분 지역에 확장되어 분포하는 콜라겐섬유는 JA군에서는 윤활관절막 자유면 기저부에서 관찰되었는데, 지방층사이의 모세혈관 주변부에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었다. 또한 섬유화주변에 침적하는 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 1-C).

2. 항염증효과

1) Pro-inflammatory cytokine 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 TNF- α 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 Fibroblast like synoviocyte(FLS)와 대식세포로 세포막에서 강한 TNF- α 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 376% 증가한 3870 \pm 110/100,000 pixel로 관찰되었다. RA

군에 비해 JA군에서는 TNF- α 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, JA군에서는 RA군에 비해 57% 감소한 1671 \pm 163/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 2).

2) 전사인자 NF- κ B 활성 억제

윤활관절막에서 분포하는 NF- κ B p65 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 대식세포로 핵막주변부에서 강한 NF- κ B p65 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 996% 증가한 4263 \pm 292/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해 JA군에서는 NF- κ B p65 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, JA군에서는 RA군에 비해 75% 감소한 1002 \pm 127/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 2).

3) iNOS 활성 억제

(1) iNOS mRNA 발현 억제

LPS 자극에 의한 Raw264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 紫何車약침액 처리 후 LPS 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 10⁻²에서 4.9%, 10⁻¹에서 48.9%가 감소하여 농도 의존

적이었다(Fig. 3).

(2) NO 생성 억제

Nitrite assay 결과 LPS 자극에 의한 Raw264.7 세포에서의 NO 생성은 19 μ M인 무처리군에 비해 198% 증가한 57 μ M로 측정되었다. 紫何車약침액 처리시 농도의존적으로 생성이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 NO 생성량에 비해 10⁻²에서 24% 감소한 43 μ M, 10⁻¹에서 25% 감소한 42 μ M로 측정되었다(Fig. 4).

(3) iNOS 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 iNOS 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 대식세포로 세포막에서 강한 iNOS 양성반응을 보였다. RA군은 정상군에 비해 1138% 증가한 5162 \pm 312/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해 JA군에서는 iNOS 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, JA군에서는 RA군에 비해 63% 감소한 1923 \pm 263/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 5).

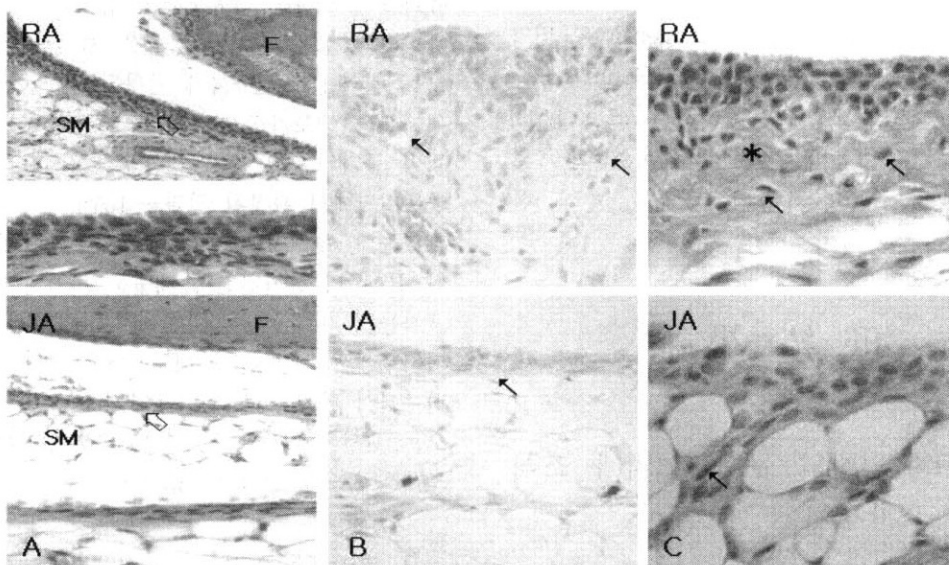


Fig. 1. Mitigation of RA-induced synovial damages by Jahage Herbal acupuncture

A. Inhibition of synovial hyperplasia (\leftrightarrow) (H&E; upper, x200; lower, x400).

B. Inhibition of angiogenesis (\leftarrow) (wright' stain, x400).

C. Inhibition of fibrosis (*, fibrosis; \leftarrow , collagen fiber) (Van Gieson's, x400).

RA: Rheumatoid arthritis elicited synovial membrane.

JA: Jahage acupuncture treated synovial membrane after rheumatoid arthritis elicitation.

F: femur.

SM: synovial membrane.

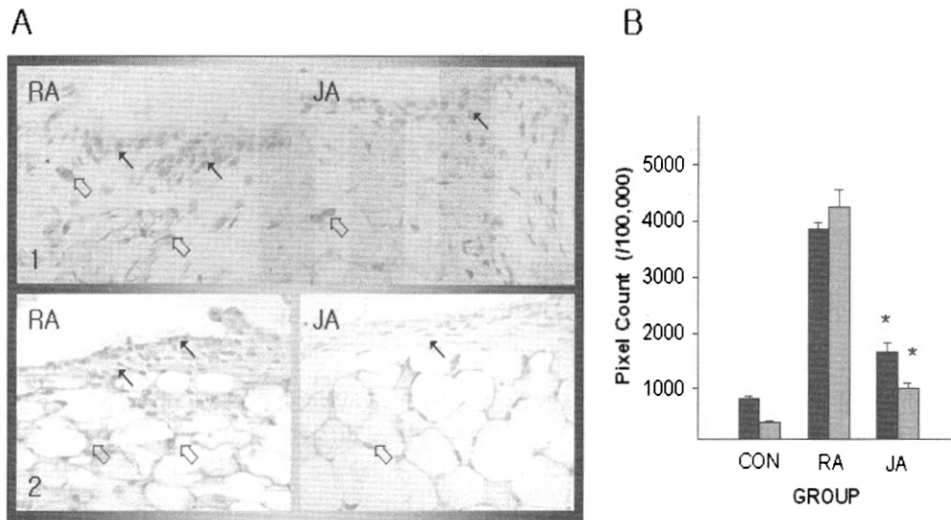


Fig. 2. Inhibition of RA-induced TNF-α & NF-κB p65 activation by Jahage acupuncture

A. Immuno-reaction of TNF-α (1) & NF-κB p65 (2) in synovial membrane (←, positive reacted fibroblast like synoviocyte; ⇐, positive reacted macrophage; x400). B. Image Analysis for TNF-α & NF-κB p65 positive reaction.

Abbreviation same as Fig. 1.

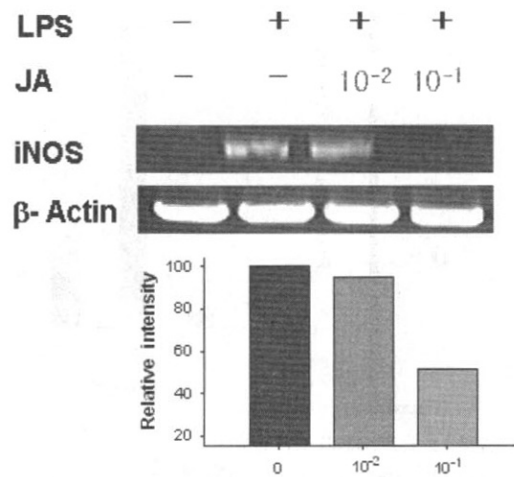


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced iNOS mRNA expression by Jahage acupuncture solution(JAS)

The RAW 264.7 macrophages were treated with 1μg/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (10⁻¹ & 10⁻²) of JAS and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS mRNA expression were dose-dependantly decreased in JAS treated RAW 264.7 cell.

LPS: lipopolysaccharide.

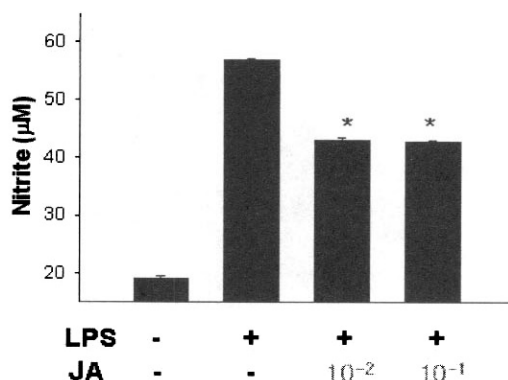


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced NO production by JAS in RAW 264.7 macrophages
 The cell were treated with 1µg/ml of LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (10⁻¹ & 10⁻²) of JAS, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced NO production were dose-dependantly decreased in JAS treated RAW 264.7 cell.
 *, P < 0.05 compared with LPS alone.

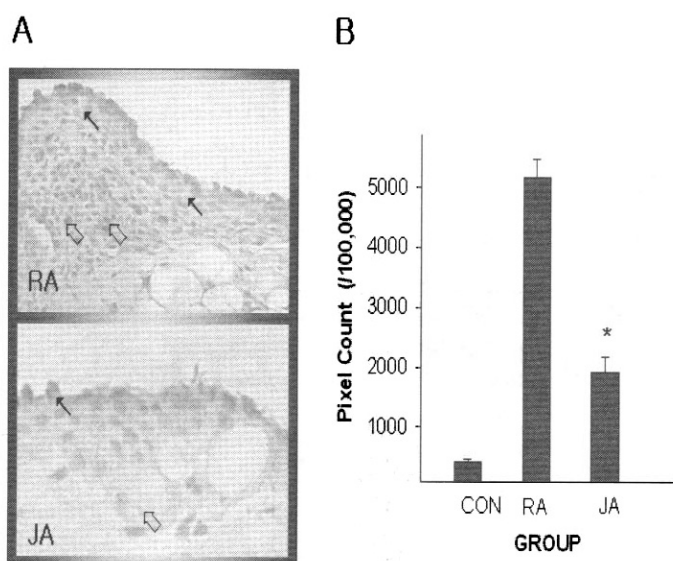


Fig. 5. Inhibition of RA-induced iNOS activation by JAS
 A. Immuno-reaction of iNOS in synovial membrane (←, iNOS positive reacted fibroblast like synoviocyte; ↗, iNOS reacted positive macrophage; x400).
 B. Image Analysis for iNOS positive reaction.
 *, P < 0.05 compared with RA.

IV. 考 察

류마티스성 관절염은 전신적인 만성 염증성 질환으로 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증이 야기되어, pannus에 의한 뼈의 파괴, 윤활관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백질분해효소, O₂ radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의

소실이 일어난다¹⁰⁾. 이러한 류마티스 관절염이 심한 경우 류마티스성 결절(rheumatoid nodules), 맥관염(rheumatoid vasculitis), 안염증(eye inflammation), 신경기능이상(neurologic dysfunction), 심폐기능장애, 림프절병증(lymphadenopathy), 비장거대증(splenomegaly)등의 관절외 류마티스증상이 발현된다¹¹⁾. 한편 류마티스성 관절염은 주로 30~40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병율을 보이고 있지만 보통 평균

유병율은 0.8%로 추정되며¹²⁾, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다.

류마티스 관절염의 초기 병변으로 미세혈관 손상과 활막 세포의 수적 증가가 나타나는데 이런 반응을 일으키는 손상의 성질은 밝혀지지 않았다. 그 후 활막세포의 증식과 더불어 단핵구세포가 혈관 주변에 침착하게 된다. 과정이 진행됨에 따라 활막은 부종이 생기며 용모와 같은 돌기가 관절강 내로 돌출하게 된다. 광학 현미경 조사를 하면 활막세포의 과증식 비대와 미세혈관 손상, 혈전, 신생혈관을 포함한 국소적, 분절적 혈관변화, 부종, 단핵구 혈관주위 침윤과 집중 등과 같은 특징적인 모양을 볼 수 있다. 류마티스 활막의 내피세포는 림프기관의 high endothelial venule(HEV)양상을 보이며 조직내로 들어가는 것을 용이하게 하는 cytokine에 의해 변화한다. 류마티스 활막 내피 세포는 이 과정에서 다양한 adhesion molecule의 양적 증가를 보인다. 이러한 병리학적 현상은 RA의 전형적인 것이기는 하나 다른 만성 염증성 관절염에서도 역시 관찰된다. 단핵구세포의 모임은 그 구성과 크기가 다양하다. 가장 우세하게 침윤하는 세포는 T 림프구이다. 주된 세포는 CD8+T세포보다 CD4+T세포로서 종종 HLA-DR+대식세포와 수상돌기 세포에 근접하여 발견된다. 또한 γ , δ 형의 수용체를 발현하는 T 세포 집단수의 증가도 활막내에서 관찰되나 RA에서 그 역할은 알려진 바 없다.

활막염에서 T 세포를 분석해보면 CD29, CD45RO를 발현하는 naive CD4+T세포의 증가와 CD45RA를 발현하는 CD4+T세포의 현저한 감소가 관찰되며 CD8+T세포는 억제형이라기보다는 주로 세포독성형이다. 류마티스 관절염은 T 세포의 축적 외에도 항체를 생산하는 형질세포로 국소적으로 분화하는 다수의 B 세포의 침윤을 특징으로 한다. 이들 세포는 polyclonal 면역글로블린과 자가항체인 류마티스인자를 생산하여 면역복합체의 국소형성을 초래한다. 원인이 되는 자극 물질을 찾지는 못했으나 이미 형성된 류마티스 관절염은 계속적인 면역활성도를 특징으로 한다. 침윤되는 T 세포는 활성화된 것으로 보이는데 그 이유는 HLA-DR과 같은 활성항원을 발현하고 있기 때문이다. 덧붙여서 T 세포는 백혈구 기능 관련 항원1(LFA-1 CD11a/CD18)과 같은 분자의 발현을 증가시키기 때문에 염증조직으로 들어가기 바로 직전에 순환세포와 후모세혈관 미세정맥간에

결합이 증가되는 것을 포함한 다양한 세포-세포간 상호 작용에 중요한 역할을 한다. 마지막으로 T 세포는 활막조직에서 감취진 항원에 반응하여 국소적으로 증식하는 것으로 생각되는데 그 이유는 T 세포의 장기간의 증식시에만 관찰되는 very late antigen-1 (VLA-1)과 같은 항원의 발현이 침윤된 T 세포에서 관찰되기 때문이다. 염증이 일어나 활막에서 B 세포의 활성화 증거가 발견되고, 특징적으로 면역글로블린과 류마티스 인자를 생산하는 형질세포 침윤이 관찰된다. 활성화된 표현형을 가진 많은 수의 대식세포 역시 류마티스 활막에서 찾아볼 수 있다.

류마티스 관절염이 발병하게 되면 류마티스 활막은 활성화된 림프구, 대식세포 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물이 존재하는 것을 특징으로 한다. 이들 cytokine의 국소적인 생산물이 RA의 병리적 임상적 양상의 원인으로 생각되고 있다. 류마티스 관절염에서 밝혀진 cytokine의 목록과 염증과정에서 그것들의 역할은 T 림프구에서 나온 IL-2, IL-2, 과립 세포-대식세포 colony 자극요소(GM-CSF), tumor necrosis factor α , transforming growth factor β ; 활성화된 대식세포에서 유래하는 IL-1, tumor necrosis factor α , IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF, platelet-derived growth factor, insulin like growth factor, transforming growth factor β ; 그 외에 fibroblast, endothelial cell 등에서 분비되는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF 등이 있다. 이들 cytokine의 활성도가 류마티스 관절염의 여러 양상인 활막조직염증, 활막 증식, 연골, 골 손상 등과 RA에서의 전신 양상을 나타내는 원인으로 생각된다. 염증반응을 널리 전하는 cytokine의 생산에 덧붙여서 cytokine 활동을 저해하는 특이 억제물질이 생산되며, T 세포 활성화와 증식, B 세포 분화와 염증 부위로의 이동 등과 같은 특징적인 염증반응을 억제하는 cytokines(transforming growth factor)의 생산 등 염증을 느리게 하는 국소 인자들이 분비된다. 이들 양상들은 유발인자는 밝혀지지 않았으나 RA의 전파가 면역학적인 매개에 의해 일어남을 시사한다¹³⁾.

류마티스성 관절염은 발병 원인이 불확실한데 반해, 류마티스성 관절염 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다. 요약해 보면, 순환액내의 type II collagen 역가 증가¹⁴⁾, proinflammatory cytokine인 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 증가¹⁵⁾, 염증성 전사인자인 Nuclear factor- κ B의 활성화와 염증효소 inducible nitric oxide

synthase (iNOS)의 증가^{16,17)} 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류마티스성 관절염의 발병 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 그래서 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬, 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug), 항TNF- α 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다.^{18,19)} 각각은 myelosuppression, 고혈압(hypertension), 간과 신장의 기능장애(hepatic and renal dysfunction) 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 關節炎은 風, 寒, 濕, 熱등의 外邪가 인체에 침입하여 經絡의 소통에 장애를 주고, 氣血의 유행을 不暢하게 하여 근육, 근골, 관절등의 부위가 시큰거리는 통증, 마비감, 관절의 기능활동이 부자유스러움과 무거움 등의 증상을 나타낸다고 보고 있으며 심해지면 관절이 붓고 열이 나는 등의 주요 임상 증상을 보인다고 보고 있다.²⁾

《素問·痺論》³⁾에 “所謂痺者, 各以其時, 重感於風寒濕之氣也” “風寒濕三氣 雜至合而爲痺也 其風氣勝者爲行痺. 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲着痺也”라고 하여痺症에 대한 원인과 증후를 기록하고 있다. 또 《金匱要略·中風歷節病》⁴⁾에서는 “歷節之痛 由汗出入水當風所致” 또 歷節, 歷節風이라고도 하는데 이는 관절이 벌겍게 붓고 통증이 극렬하여 펴거나 굽히기 어려운 것이 특징이다. 대개는 肝腎이 부족한데 風寒濕을 받아 이것이 다시 관절에 침입하여 오랫동안 머물면서 열로 변하여 氣血을 울체시켜 나타난다. 이러한 임상증상으로 볼 때 류마티스 관절염은 한의학적으로 보아 痺나 歷節風으로 볼 수 있다.

최근의 보고에서는 도 등⁵⁾은 LPS로 유발된 류마티스 관절염에 유백피, 계지, 우슬, O.K. 및 해독 약침을 주입하여 유의한 효과를 보고 하였고, 안 등⁶⁾은 녹용약침액이 자가항원제시형 Cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염에 미치는 효과를 보고 하였으며, 정 등⁷⁾은 사향, 우황, 옹담의 복합제제 약침이 류마티스 관절염유발 쥐의 혈액학적 변화 및 Collagen 분포변화를 통해 유의한 치료효과를 보고 하였고, 이 등⁸⁾은 봉독약침이 류마티스 관절염 환자

의 관절 통증, 종창 및 급성염증반응에 미치는 영향을 연구하여 유의한 치료효과를 보고 하였고 남 등⁹⁾은 소풍활혈탕을 이용하여 歷節風에 대한 유의한 치료효과를 보고하였다. 하지만 紫何車 약침을 사용한 약침연구는 아직 접하지 못하였다.

紫何車는 건강한 사람의 胎盤을 烘製하여 乾燥한 것으로 불규칙한 類圓形 또는 碟狀橢圓形을 이루고 지름 9-16cm, 두께는 일정하지 않다. 표면은 자홍색 또는 갈홍색으로 한쪽면은 울룩불룩하고 고르지 않으며 많은 주름이 있고, 다른 한쪽면은 羊膜에 싸여 있어 비교적 광활하고 중앙 또는 한쪽에 臍帶가 붙어 있는 것도 있다. 질은 굳은 편이나 잘 부스러지고 한개의 무게는 약 35-70g이다. 성분은 estradiol, progesterone, acetyl glucosamine, D-galactose, mannose, amino acid 등을 함유한다. 紫何車는 性이 溫·無毒하고 味가 甘鹹하여 肺, 肝, 腎經에 입하여 補氣, 養血, 益精하여 治虛損羸瘦, 勞熱骨蒸, 咳喘, 咯血, 盜汗, 遺精, 陽痿, 婦女血氣不足, 不孕或乳少하고 甘味에 鹹味를 겸하고 性이 溫하되 燥하지 않아 肺, 肝, 腎 등 三經에 들어가 氣血을 크게 補하고 腎精을 補益시켜 久病으로 인한 身體虛弱이나 혹은 體質虛弱과 氣血不足 및 腎虛精虧등 증을 치료하는데 單味 또는 複方에 配伍하여 응용하면 좋은 효과가 있다고 한다. 오늘날 임상에서는 強壯藥으로 인체의 抵抗力을 增強케하여 肺結核, 神經衰弱, 貧血, 氣管支喘哮등 慢性病에 응용하고 있다.²⁰⁾

紫河車 약침의 함유성분에는 각종 간세포나 상피세포, 신경세포 등을 생성하는 세포증식인자, 독감이나 암 등의 바이러스를 억제하는 다종의 인터페론, 그리고 인터루킨 코로니 형성 자극인자를 함유하고 있다. 면역에 관여하는 글로브린 알부민을 함유하고 있으며 각종 호르몬 및 그 전구체 즉 성선자극 호르몬(여성의 난포형성과 남성의 정자형성을 자극하는 호르몬, 황체형성호르몬)유즙분비를 촉진하는 호르몬인 프로락틴, 성장호르몬(GH), 성장과 조절 수대사 단백질대사 지질대사에 관여하는 갑상선자극호르몬(TSH), 부신피질자극 호르몬(알도스테론, 코티손, 코티솔, 에스트로겐, 안드로겐등의 호르몬분비촉진), 주로 전립선과 정낭에서 추출되며 장과 자궁의 혈관확장에 관여하는 프로스타글라딘, 그리고 55종의 각종 효소, 세포내 DNA, RNA 등의 핵산형성에 관여하는 핵산관련물질, 각종 아미노산, Na, Ca, K, Mg, P, Ir 등의 미네랄, 뮤코다당체, 비타민 등을 함유하고 있다. 그러므로 조직재생의 목적이나 항체형성으로 감

염을 억제하고 저항력을 키울 목적 또는 호르몬 효과등이 필요한 병증에 사용한다고 한다²¹⁾.

藥針療法이란 기존의 針法과 韓藥을 결합하여 발전시킨 신침요법의 일종으로, 한약제제를 經穴의 자극수단으로 사용하는 것을 말한다. 즉 藥針療法이란 순수 한약재에서 정제, 추출하여 침을 놓을 자리(經穴)에 극소량의 약물을 주입함으로써 針의 작용과 韓藥의 작용을 병행하여 치료를 보다 극대화 시키기 위한 針療法을 말한다²²⁾.

이에 저자는 紫河車 藥針의 류마티스 관절염에 대한 치료효과를 확인하기 위해 류마티스 관절염을 유발한 생쥐에 紫河車 藥針을 內膝眼(EX-LE201)과 犢鼻(ST35)에 상응하는 생쥐의 무릎부위에 시술한 후 윤활관절막의 일반적인 형태변화, 혈관분포, 섬유화, TNF- α , NF- κ B p65, 염증성 효소 iNOS 변화를 조사하여 유의성 있는 효과를 얻었다.

본 연구에서 RA 유발시 윤활관절막의 두께 비후는 자유면에 위치한 윤활분비세포 또는 섬유모세포유사윤활세포(fibroblast like synoviocyte; FLS)의 세포과형성으로 기인된 것으로 FLS의 증가는 IL-1 β , IL-2, cell adhesion molecular (CAM)을 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생성 증가와 섬유화(fibrosis)와 염증부위로의 이주세포의 증가를 유도한다²³⁾. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1 β 신호기전에 의한 것으로 collagen fiber의 합성 촉진과 collagenase의 합성 또한 유도하고²⁴⁾, 관절염 유발시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용²⁵⁾, 관절내 연골과 연골하 골조직의 파괴²⁶⁾ 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다²⁷⁾. 본 실험에서도 RA유발군의 윤활관절막내에서 FLS의 세포과형성, 혈관신생성 증가, 섬유화 증가를 확인할 수 있었다.

FLS의 세포과형성은 TNF- α 의 분비 증가를 일으키며, 그 결과 염증관련 전사인자인 NF- κ B의 활성을 유도한다. 전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 염증효소 iNOS 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다²⁸⁻³⁰⁾. iNOS는 ROS의 일종인 산화질소를 생성하는데, 산화질소(NO)는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직

의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다²⁶⁾. 본 실험에서도 NF- κ B p65의 분포가 FLS와 대식세포에서 증가된 양상을 보였으며, 순차적으로 iNOS 양성반응세포의 조직내 분포 증가와 NO 생성 증가를 일으켰다.

이와는 달리 紫河車藥針군의 윤활관절막내에서는 FLS의 세포과형성, 혈관신생성, 섬유화 등이 RA 유발군보다 적었으며, TNF- α 의 분비 유도가 억제되어 NF- κ B 활성을 저해함으로써 염증효소 iNOS의 작용을 차단하게 되어 염증으로 유발되는 윤활관절막내 조직 손상을 막았다. 이상의 결과로 紫河車藥針은 전염증효소의 분비 조절을 통한 NF- κ B 활성 억제로 류마티스성 관절염로 기인된 조직 손상을 완화시키는 치료 효과를 보이는 것으로 생각된다.

V. 結 論

紫河車藥針의 류마티스성 관절염에 대한 치료효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 紫河車藥針액의 염증성효소 iNOS 유전자 발현과 NO 생성을 조사하였고 인위적으로 류마티스성 관절염이 유발된 생쥐의 內膝眼(EX-LE201)과 犢鼻(ST35)에 상응하는 무릎 부위에 紫河車藥침 시술 후 나타나는 윤활관절막의 일반적인 형태변화, 혈관분포, 섬유화, pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , 염증관련 전사인자 NF- κ B p65, 염증성 효소 iNOS 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 紫河車추출물이 처리된 Raw 264.7 cell에서는 iNOS mRNA 발현은 농도 의존적으로 감소하였고, NO 생성도 적었다.
2. 紫河車藥針이 시술된 생쥐의 윤활관절막내에서는 윤활관절세포의 세포증식 감소, 혈관신생성 감소, 섬유화와 섬유모세포의 분포 감소가 관찰되었다.
3. 紫河車藥針이 시술된 군에서는 RA유발군에 비해서 류마티스성 관절염 관련 Cytokine TNF- α , NF- κ B p65, iNOS 양성반응이 감소하였다.

이상의 결과로 紫何車藥針은 TNF- α 활성 차단을 통한 항염증작용으로 류마티스성 관절염에 대한 조직 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

VI. 參考文獻

- 배상철. 류마티스 관절염 치료의 최신 지견. 가정의학회지. 2001 ; 22(1) : 21-6.
- 김무진, 윤종화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 관절염의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 191.
- 王琦 外. 皇帝內經素問金釋. 서울 : 정보사. 1983 : 206.
- 張中景. 金匱要略方論. 대만 : 동방서점. 1950 : 30-39.
- 도원석, 김갑성. LPS로 유발된 류마티스 관절염에 유백피, 계지, 우슬, O.K. 및 해독 약침이 미치는 영향. 한의정보학회지. 1998 ; 4(1) : 81-93.
- Ahn Hyung-jun, Kim Kap-sung. Inhibitory Effect of Deer Antler Aqua-acupuncture (DAA) on Cathepsin S Activity and Rheumatoid Arthritis in Rats. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2000 ; 20(3) : 104-114.
- 정경연, 김갑성. 사향, 우황, 응담 복합제제약침이 백서의 류마티스성 관절염증 혈액학적 변화 및 collagen 분포 변화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 255-268.
- 이상훈, 이현중, 백용현, 김수영, 박재경, 홍승재, 양형인, 김건식, 이재동, 최도영, 이두익, 이윤호. 봉독약침이 류마티스 관절염 환자의 관절 통증, 중창, 및 급성 염증반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(2) : 77-84.
- 남영, 채병윤. 歷節風에 疎風活血湯이 미치는 消炎 鎮痛 解熱 및 albumin 응고에 관한 실험적 고찰. 경희한의대논문집. 1981 ; 4 : 145-151.
- Peter Schenck, Stefan Schneider, Rolf Miehke, and Peter Prehm. Synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 1995 ; 22 : 400-405.
- Stephen LD, Koda-Kimble MA. eds. Rheumatic disorders, Applied Therapeutics : the clinical use of drugs. 6th, ed. Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, WA : Appl. Therap. Inc. 1995 ; 41 : 1-27.
- Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. Harrison's principle of internal medicine. 16th ed. New York ; McGraw Hill. 2005 ; 1968-77.
- Kurt J. Isselbacher. 해리슨 내과학. 서울 : 정담출판사. 1997 : 1779, 1780.
- Leo A B, Joosten Monique M A Helsen Fons A J van de Loo Wim B van DE Bern. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in dba/a mice. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
- Leech M, Metz C N, Smith M, Weedon H, Holdsworth S R, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis : evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum. 1999 ; 42 : 1601-8.
- Sampey A V, Hall P H, Mitchell R A, Metz C N, Morand E F. : Regulation of synoviocytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1273-80.
- Yasmina J, Catalina A, Carmen M, Alicia A, Irene G, Florencia R, Rosa P, Javier L. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. & Therapy. 2005 ; 7 : R1034-1045.
- Matthew H. Ornstein and Kirk Sperber. The antiinflammatory and antiviral effects of hydroxychloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis, Arthritis Rheum. 1996 ; 39(1) : 157-161.
- 송정수. 류마티스관절염의 완치를 향하여. 대한내과학회지. 2005 ; 69(6) : 581-589.
- 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 2000 : 567, 568.

21. 대한약침학회. 약침요법총론. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 323.
22. 대한약침학회. 약침요법총론. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 318.
23. Carlene Tsai, Luis A Diaz, JR, Nora G Singer, Lan Lan Li, Anita H Kirsch, Raj Mitra, Brian J Nickoloff, Leslie J Crofford and David A Fox. Responsiveness of Human T Lymphocytes to Bacterial superantigens presented by cultured Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *Am. College Rheumto.* 1996 ; 39(1) : 125-136.
24. Mizel S B, Dayer J M, Krane S M, and Mergenhagen S E. Stimulation of Rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor(IL-1). USA : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981 ; 78 : 2474-2486.
25. Pettipher E R, Higgs G A and Henderson B. : IL-1 induces leukocytes infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. USA : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986 ; 83 : 8749-8756.
26. Saklatvala J. IL-1 - Purification and biochemical aspects of its action on cartilage. *J. Rheum.* 1987 ; 14 : 52-58.
27. Bunning R, Crawford A, Richardson H, Opendakker G, van Damme J and Russell R. IL-1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1987 ; 924 : 437-449.
28. Baeuerle P A. IκB-NF-κB structure : at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998 ; 95 ; 729-731.
29. Z Morise, S Komatsu, J W Fuseler, D N Granger, M Perry, AC Issekutz and M B Grisham. ICAM-1and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. *Am J Physio.* 1998 ; 27 ; G246-252.
30. Y-X Li, N Li, Y-S Li, B Wu and J-S Li. Upregulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allgrafts. *Transplant Proceed.* 2000 ; 32 ; 1283-1286