

원저

## 鹿茸藥鍼이 CIA 모델 생쥐의 염증인자 생성억제에 미치는 영향

황종순\* · 황지혜\* · 이현진\* · 이동건\* · 강민주\*\* · 백성욱\* · 조현석\* · 김경호\* · 김갑성\*

\*동국대학교 한의과대학 침구학교실

\*\*이성수한의원

### Abstract

### The Ability of *Cervus Elaphus Sibiricus* Herbal Acupuncture to Inhibit the Generation of Inflammatory Enzymes on Collagen-induced Arthritis Mice

Hwang Jong-soon\*, Hwang Ji-hye\*, Lee Hyun-jin\*, Lee Dong-gun\*, Kang Min-joo\*\*,  
Back Song-ook\*, Cho Hyun-seok\*, Kim Kyung-ho\* and Kim Kap-sung\*

\*Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,  
Dongguk University

\*\*Lee Sung Soo Oriental Medical Clinic

*Backgrounds* : Rheumatoid Arthritis(RA) is known as the chronic inflammatory disease that induces persistent inflammation in the joint cavity. The destruction of cartilage occurs as the result of bones destroyed by pannus, several influential cytokines induced by the synovial capsulitis, varieties of proteinases, O<sub>2</sub> radicals, and the secondary degenerative changes of articular cartilage. The type 2 collagen-induced arthritis model is used in recent experimental research on rheumatoid arthritis. *Cervus elaphus sibiricus* (Nockyong) has the effect of relieving pain by nourishing the muscles, joints, and bones. It is also known to be efficacious in promoting and enhancing the immune system. The objective of this study was to investigate the effect of *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture to inhibit the generation of pro-inflammatory enzyme on type 2 collagen-induced arthritis. I investigated the inhibition of mRNA transcription of MIF(macrophage migration inhibitory factor), TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) and MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) of *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture using an in vitro test. Also investigated was the inhibition of differentiation of Th 1 cells and activation of cytokines(MIF, TNF- $\alpha$ , IL-6, MMP-9), which are known to cause initial RA ,and are also related to the morphology of the syno-

· 접수 : 2007년 11월 26일 · 수정 : 2007년 11월 28일 · 채택 : 2007년 11월 28일  
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교 병원+한방병원 침구과  
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

vial membranes of the joint capsule, by an in vivo test, using CIA(collagen induced arthritis) model mice.

**Materials & methods :** The laboratory animals used in this experiment were 4 week-old DBA female mice, weighing approximately 20 grams, and adjusted to the laboratory environment. The experiment was divided into the normal group(NOR)-no treated group, control group(CON)-CIA induced group, and sample group(SAM)-*Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture treated group. RA was induced in the mice via injection of 50 $\mu$ l CII mixed CFA. The *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture solution was applied on GB<sub>35</sub>(陽陵泉) for 26 days from the 3rd day of RA inducement. The concentration of the solution was determined via a MTT assay. To research the effect on the expression of MIF, TNF- $\alpha$  and MMP-9 mRNA, RT-PCR was performed on synovial membrane cells from the knee joint of CIA mice. CII induced RA knee joint's histo-chemical synovial membrane was observed using a specimen model via the Hematoxylin and Eosin dying technique.

**Results :** The expression of mRNA of RA-related cytokines such as MIF, TNF- $\alpha$ , and MMP-9 dose-dependently decreased in the cell from the synovial membranes of the joint, which is treated with *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture solution. In mice treated with *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture, the damage of synovial membranes of the joint was lessened, and differentiation of Th 1 cells was suppressed. The activation of RA-related cytokines such as MIF was suppressed, and the generation of TNF- $\alpha$  and MMP-9 showed a statistically significant decrease.

**Conclusions :** It is speculated that *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture has the therapeutic effect of palliating the damage of the tissue impaired by RA by inhibition of the initial RA progression and by regulating excessive differentiation of Th 1 cell as it suppresses the generation of RA-related cytokines during the highest stage of RA by acting on pro-inflammatory enzymes.

**Key words :** Rheumatoid-arthritis(RA), *Cervus elaphus sibiricus* herbal acupuncture, CIA

## I. 서론

류마티스 관절염은 활막의 만성염증과 증식을 특징으로 하는 대표적인 자가면역질환이다<sup>1)</sup>. 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증이 야기되어 pannus에 의한 뼈의 파괴, 각종 cytokine의 영향에 의한 윤활관절막염의 형성, 다양한 단백질분해효소, O<sub>2</sub> radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 일어난다<sup>2)</sup>.

한의학에서 류마티스 관절염을 직접 언급한 바는 없지만 문헌에 기록된 증상으로 미루어 볼 때 痺<sup>3)</sup>, 歷節風<sup>4)</sup>, 白虎歷節風<sup>5)</sup>, 痛風<sup>6)</sup> 및 類風濕性關節炎<sup>7)</sup> 등과 매우 흡사하다. 《金匱要略》<sup>8)</sup>은 최초로 “歷節風”을 頑固한 痺證으로 언급하면서 關節의 심한 통증과 不能屈伸 증상이 수반된다고 하여 류마티스 관절염과 매우 흡사한 질환으로 서술하고 있다.

류마티스 관절염의 치료는 장기간 약물치료를 지속해야 하는 만성 질환이라는 점에서 효능이 극대화되고 부작용이 적은 제재 개발이 필요한 실정이다. 이러한 점에서 근래 동물 실험에 의한 약침 제제의 연구들이 많이 이루어지고 있는데, 黃柏과 威靈仙<sup>9)</sup>, 防己<sup>10)</sup>, 牛膝<sup>11)</sup>과 蜂毒<sup>12)</sup>, 澤瀉<sup>13)</sup>, 赤芍藥<sup>14)</sup>, 桂枝<sup>15)</sup>, 牛黃<sup>16)</sup>, 榆根皮<sup>17)</sup> 등의 다양한 한약재를 약침제제화하여 면역기능에 작용하는 바를 조사하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

이 중 녹용은 면역관계물질의 생성 촉진효과나 염증물질 생성 억제에 작용하여 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환에 유효한 영향을 미친다는 연구보고가 다수 있다<sup>18) 20)</sup>. 그러나 지금까지의 연구들은 실험 과정에서 *in vitro*나 *in vivo* 중 한 가지 방법만을 사용한 경우가 많았고, 녹용약침이 관절염의 초기 단계의 전염증효소들에 작용하는 영향에 관한 보고는 아직 미미하다.

이에 저자는 녹용약침액을 제조하고 collagen induced arthritis(CIA) 모델의 생쥐를 대상으로 하여 *in vitro* 상에서 녹용약침액의 macrophage migration inhibitory factor(MIF), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), matrix metalloproteinase-9(MMP-9) mRNA 활성 억제와 *in vivo* 상에서 녹용약침의 Th 1 및 Th 2 세포분화 변화, 윤활관절막의 일반적인 형태 및 초기 CIA 유발 관련 cytokine(MIF, TNF- $\alpha$ , IL-6, MMP-9) 활성 억제에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 동물

태령 4주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트, 한국)를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

#### 2) 재료

##### (1) 약침기

1cc 일회용 주사기(Safe1ne/경기의료공업, 한국)에 30gauze 1/2" 일회용 주사침(정림의료기산업(주), 한국)을 사용하였다.

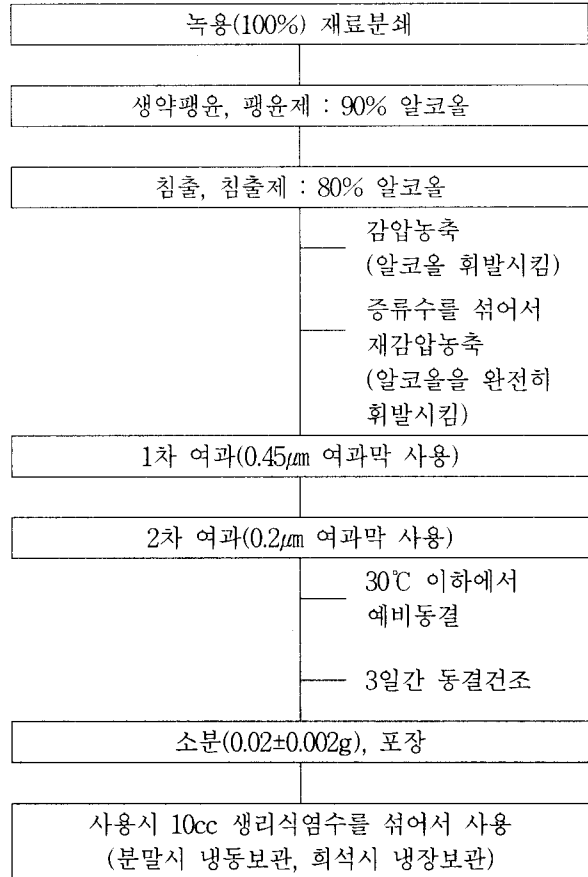
##### (2) 약침원료 및 약침액의 제조

시중에서 구입하여 정선한 러시아산 녹용(*Cervus elaphus sibiricus*; 이하 Nockyong으로 영문표기함)을 다음과 같은 약침 제조과정을 거쳐 녹용약침화하였다(Scheme 1).

### 2. 방법

#### 1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 생쥐 무릎의 윤활관절세포는 관절염이 유발된 암컷 DBA 생쥐 무릎관절에서 적출하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 윤활관절주머니를 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, USA)에 2시간 동안 반응하여 윤활관절막을 분리하고 세절하였다. 0.1% collagenase에 37°C에서 1시간 동안 처리 한 다음 3,000



Scheme 1. Processing of the Nockyong herbal acupuncture solution

Abbreviation.

Nockyong ; *Cervus elaphus sibiricus*.

rpm에 5분간 원심분리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS ; Sigma, USA)가 함유된 DMEM을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3-5회 계대배양 세포를 사용하였다.

#### 2) *In vitro*에서 녹용약침액의 CIA 관련 cytokine 유전자 발현 조사

##### (1) 농도량 조절을 위한 MTT assay

실험에서 약물의 첨가농도는 MTT assay를 통해 결정되었다. MTT assay는 우선 96well plate에 윤활관절세포(5 $\times$ 10<sup>3</sup>cells/well)를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium(Sigma, USA)으로

교환하여 4시간 동안 안정화시키고, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/ml 농도로 녹용약침액을 첨가하여 24시간 배양하였다. 그리고 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT ; Sigma, USA) 2mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide(DMSO ; Sigma, USA)로 용해시켜 595nm의 파장에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포생존률을 계산하였다. 녹용약침액 1.0mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

(2) 녹용약침액의 RA 관련 cytokine 유전자 발현 조사

녹용약침액이 초기 RA 유발을 주도하는 cytokine 인 MIF, 전염증 cytokine(pro-inflammatory cytokine)인 TNF- $\alpha$  그리고 단백질분해효소인 MMP-9 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 유허관절세포- $5 \times 10^5$  cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate(Final 1ng/ml)를 1시간 처리하여 RA 관련 cytokine mRNA 발현을 유도하였다. 녹용약침액 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu$ g/ml을 농도별로 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, MIF, TNF- $\alpha$  그리고 MMP-9 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1).

PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동 하

여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인  $\beta$ -actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

3) *In vivo*에서 녹용약침의 CIA 관련 cytokine 발현 조사

(1) 항원제조와 관절염 유도

CIA 유발을 위해 우선 native bovine type II collagen(CII, Chondrex, USA)을 10mM acetic acid에 4 mg/ml의 농도로 녹인 후 4°C에서 12시간 동안 교반하였다. CII와 4mg/ml의 complete Freund's adjuvant containing Mycobacterium tuberculosis strain H37RA (CFA, Chondrex, USA)를 동량으로 섞은 후 균질기를 이용하여 1,000rpm의 속도로 혼합하였다. CIA의 유발을 위한 1차 접종을 CII와 CFA 혼합액 50 $\mu$ l를 꼬리연결 근육부위에 피내주사를 통해 이루어졌으며, 1차 접종 2주 후에 CII와 CFA 혼합액 25 $\mu$ l를 발바닥에 추가 접종하여 CIA를 유발하였다. CIA 유발 후 1주일간격으로 발의 두께 변화를 dial thickness cage (Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

(2) 실험군의 분류 및 녹용약침의 시술

① 분류

아무런 처치도 하지 않은 정상군(NOR), 관절염을 유발시킨 대조군(CON), 관절염 유발 후 녹용약침 시술을 한 실험군(SAM)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

② 시술

CIA 유발 3일부터 28일까지 녹용약침 50 $\mu$ l을 陽陵

Table 1. The Primer of MIF, TNF- $\alpha$ , MMP-9 and  $\beta$ -actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product(bp <sup>†</sup> )	No. of cycles
MIF	sense	5'-CACCATGCCTATGTTTCATCGTGAACA-3'	404	35
	antisense	5'-GGGCTCAAGGCGAAGGTGGAACCGTT-3'		
TNF- $\alpha$	sense	5' TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG 3'	364	30
	antisense	5' CCT GTA GCC CAC GTA GTA GC 3'		
MMP-9	sense	5'-AGGCCTCTACAGAGTCTTTG-3'	824	30
	antisense	5'-CAGTCCAACAAGAAAGGACG-3'		
$\beta$ -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

† : base pair.

泉(GB<sub>24</sub>)<sup>21</sup>에 상응하는 부위에 매일 시술하였다.

### (3) 윤활관절 표본 제작

CIA 유발 28일 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 파라핀에 포매하여 5 $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

### (4) 면역조직화학적 관찰

#### ① 윤활관절막내 T 림프구 분화 관련 cytokine의 변화 관찰

CIA 유발 후 윤활관절막 내의 Th 세포 분화 변화를 조사하기 위해 Th 1 세포 분화에 관여하는 CD28 분자와 IL-12를, Th 2 세포분화에 관여하는 IL-4 생성 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다. 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 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 5일 동안 반응시켰으며, 2차항체(1 : 100, Santacruz, USA)에 3일 동안 link하였다. Avindin biotin complex(ABC) kit(DAKO, Denmark)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 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### ② 윤활관절막내 초기 CIA 유발 관련 cytokine의 변화 조사

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF, 전염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 receptor(IL-6R)- $\alpha$  그리고 단백분해효소인 MMP-9의 윤활관절막내 분포변화를 조사하기 위해 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

### 3) 영상분석과 통계처리

Cytokine 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시

하였다. 영상분석 결과는 mean $\pm$ standard deviation 으로 나타내었으며 Sigmaplot 2000(SPSS Inc. USA)을 이용하여 t-test를 시행하여 p<0.05인 경우 유의성을 인정하였다.

## III. 결 과

### 1. 녹용약침액이 윤활관절세포의 CIA 유발 관련 cytokine 유전자 발현 억제 효과

#### 1) MIF 유전자 발현 억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 MIF mRNA 발현은 증가하였는데, 녹용약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA 자극시 발현되는 MIF mRNA 발현량에 비해 0.4mg/ml에서 0.8%, 0.6mg/ml서 5.7%, 0.8mg/ml에서 8.5%, 1.0mg/ml에서 30.3%가 감소하였다(Fig. 1).

#### 2) TNF- $\alpha$ 유전자 발현 억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 증가하였는데, 녹용약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극시 발현되는 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량에 비해 0.4mg/ml에서 7.7%, 0.6mg/ml에서 9.4%, 0.8mg/ml에서 16.2%, 1.0mg/ml에서 43.2%가 감소하였다(Fig. 1).

#### 3) MMP-9 유전자 발현 억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 MMP-9 mRNA 발현은 증가하였는데, 녹용약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극시 발현되는 MMP-9 mRNA 발현량에 비해 0.4mg/ml에서 12.5%, 0.6mg/ml에서 21.1%, 0.8mg/ml에서 36.2%, 1.0mg/ml에서 53.2%가 감소하였다(Fig. 1).

### 2. 녹용약침의 CIA 생쥐 윤활관절막 손상 완화 효과

#### 1) 발두께 변화

정상군에 비해 대조군에서는 부종에 의한 발 두께가 크게 증가하였는데, 원래 두께에서 비해 CIA 유발 7일 경과 후 가장 큰 증가를 보였다. 이후 시간이 경

과할수록 발두께는 감소하는 경향을 보였다. 실험군에서는 대조군에 대하여 1일을 제외한 7, 14, 21, 28일에서 발두께가 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Table 2, Fig. 2-A).

## 2) 일반적인 형태 변화

CIA 유발 후 윤활관절막의 첨부표면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 첨부표면의 두

께 증가였다. 윤활강 쪽으로 많은 돌기(filopodia)를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 첨부표면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 첨부표면 쪽으로 침윤하는 림프구의 증가도 확인할 수 있었다. 그러나 실험군은 대조군에서 나타난 형태변화와는 다른 양상으로 나타났다. 우선 대조군에 비해 실험군은 윤활관절막의 첨부표면 두께 증가가 적었고, 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소한 것으

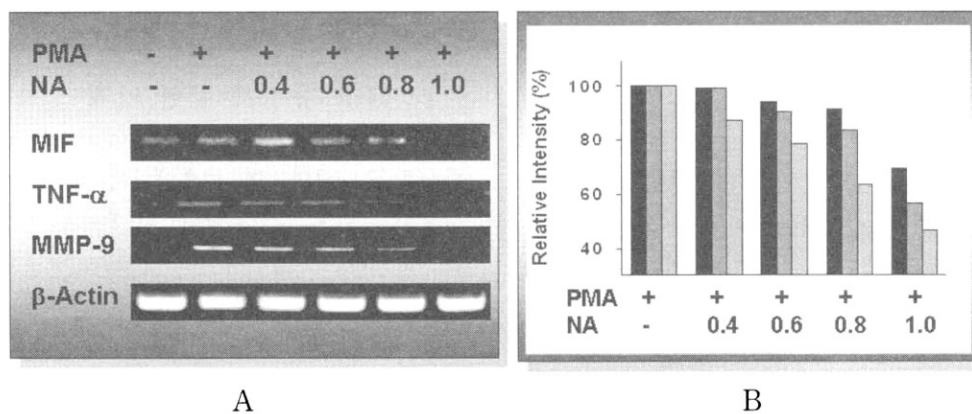


Fig. 1. Inhibition of RA-related cytokine by Nockyong herbal acupuncture(*In vitro*)

A. Inhibition of MIF, TNF-α and MMP-9 mRNA expression.

The synoviocytes cells were treated with PMA for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations(0.4, -1.0mg/ml) of Nockyong herbal acupuncture, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced MIF, TNF-α and MMP-9 mRNA expression were dose-dependantly decreased in Nockyong herbal acupuncture treated synoviocytes.

B. Relative intensity for MIF(■), TNF-α(▒) and MMP-9(▓) mRNA expression.

PMA ; phorbol-12-myristate-13-acetate.

NA ; Nockyong extract.

MIF ; macrophage migration inhibitory factor.

TNF-α ; Tumor necrosis factor-α.

MMP-9 ; matrix metalloproteinase-9.

Table 2. Inhibition of Foot Thickness in Collagen Induced Arthritis(CIA) Evoked Mouse by Nockyong Herbal Acupuncture

Objective	Group		
	NOR	CON	SAM
1th day	1.85±0.13	1.81±0.12	1.79±0.14
7th day	1.84±0.14	4.46±0.13	3.75±0.15*
14th day	1.84±0.16	4.01±0.14	3.18±0.12*
21th day	1.78±0.13	3.89±0.15	2.88±0.13*
28th day	1.80±0.15	3.85±0.12	2.70±0.14*

Data mean±standard deviation ; \*,  $P < 0.05$  compared with CON.

(Thickness : mm)

NOR ; No treated group.

CON ; CIA elicited group.

SAM ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

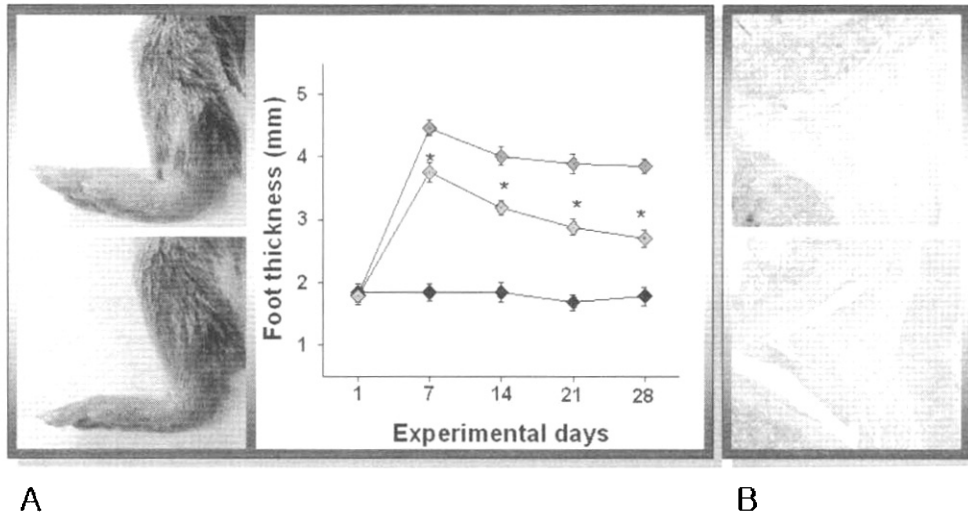


Fig. 2. Mitigation of CIA in foot and knee joint by Nockyong herbal acupuncture  
 A. Inhibition of foot thickness(upper photo, CON ; lower photo, SAM,  $\times 4$ ).  
 B. Inhibition of CIA damaged synovial membrane(upper photo, CON ; lower photo, SAM, Hematoxylin & Eosin,  $\times 40$ ).  
 \*  $P < 0.05$  compared with CON.  
 NOR(◆) ; No-treated group.  
 CON(◇) ; CIA elicited group.  
 SAM(◆) ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

Table 3. The Image Analysis for Suppression of Th 1 Cell Differentiation and Activation of Th 2 Cell Differentiation by Nockyong Herbal Acupuncture

Objective	Group		
	NOR	CON	SAM
CD28	942±85	3280±142	1535±57*
IL-12	542±37	3343±139	1399±68*
IL-4	401±34	1727±57	3392±118*

(image analysis for 200,000 pixels/range of intensity : 80-120)

Data mean±standard deviation ; \*,  $P < 0.05$  compared with CON.  
 NOR ; No treated group.  
 CON ; CIA elicited group.  
 SAM ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

로 관찰되어, 대체적으로 정상군에서 관찰되는 윤활관절막과 같은 매끄러운 표면 상태로 나타났다. 또한 윤활관절막 침부표면으로의 림프구 침윤 증가도 대조군보다는 적었다(Fig. 2-B).

### 3. 녹용약침의 CIA 생쥐 윤활관절막내 Th 림프구에 미치는 영향

#### 1) Th 1 림프구 분화 억제

Th 1 세포분화 신호기전에 관여하는 CD28의 양성 반응세포의 분포는 대조군에서는 증가한 반면 실험군

에서는 감소하였다. 이런 CD28 양성반응세포는 윤활관절막 전 부위에 분포하였고, 핵주변 주변세포질에서 강한 양성반응을 보였다. CD28 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 3,280±142(pixels)로 증가한 반면, 실험군은 1,535±57(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Table 3, Fig. 3-A).

한편 Th 1 세포분화에 관여하는 cytokine인 IL-12의 양성반응세포의 분포도 대조군에서는 증가한 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 IL-12 양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-12 양성반응의 영상분

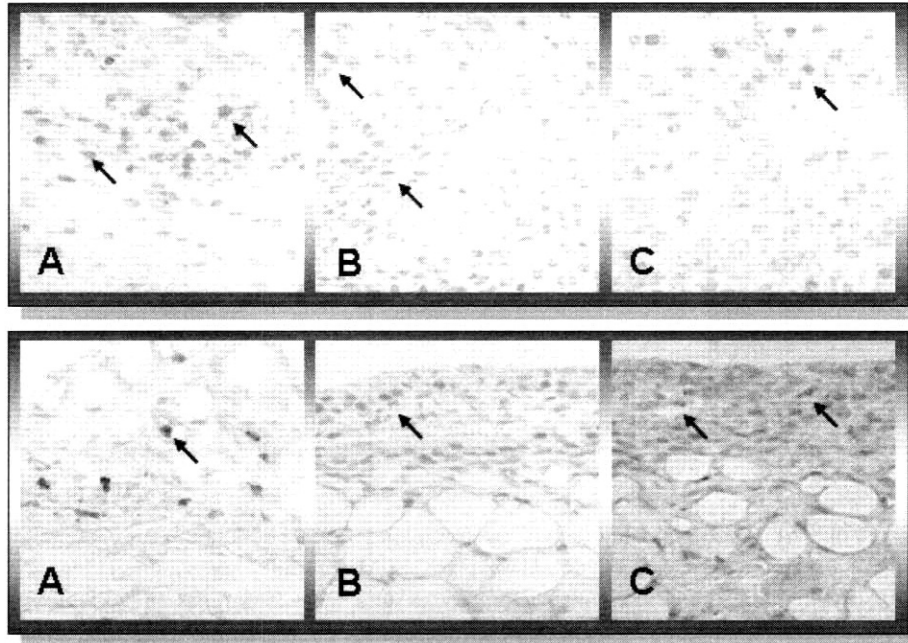


Fig. 3. Suppression of Th 1 cell differentiation and activation of Th 2 cell differentiation by Nockyong herbal acupuncture(CON, Upper-box ; SAM, Lower-box)

A ; Suppression of CD28(CD28(arrow) immunohistochemistry,  $\times 1000$ ).  
 B ; Inhibition of IL-12(arrow) production(IL-12 immunohistochemistry,  $\times 1000$ ).  
 C ; Activation of IL-4(arrow) production(IL-4 immunohistochemistry,  $\times 1000$ ).  
 CON ; CIA elicited group.  
 SAM ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

석 결과 대조군은 정상군에 비해  $3,343 \pm 142$ (pixels)로 증가한 반면, 실험군은  $1,399 \pm 68$ (pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Table 3, Fig. 3-B).

## 2) Th 2 림프구 분화 활성화

Th 2 세포분화에 관여하는 cytokine인 IL-4의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 감소하는 반면 실험군에서는 증가하였다. 이런 IL-4 양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-4 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해  $1,727 \pm 57$ (pixels)로 증가하였고, 실험군은  $3,392 \pm 118$ (pixels)로 유의성 있는 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Table 3, Fig. 3-C).

## 4. 녹용약침의 초기 CIA 관련 cytokine 생성 억제 효과

### 1) MIF 생성 억제

초기 RA 유도 cytokine인 MIF의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감

소하였다. 이런 MIF 양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해  $3,151 \pm 184$ (pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해  $2,126 \pm 95$ (pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Table 4, Fig. 4-A).

### 2) TNF- $\alpha$ 생성 억제

전염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 TNF- $\alpha$  양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF- $\alpha$  양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해  $2,834 \pm 147$ (pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해  $1,242 \pm 36$ (pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다( $p < 0.05$ )(Table 4, Fig. 4-B).

### 3) IL-6 생성 억제

전염증 cytokine인 IL-6의 양성반응세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였



Table 4. The Image Analysis for Inhibition of Arthritis Related Cytokine Production by Nockyong Herbal Acupuncture

Objective	Group		
	NOR	CON	SAM
MIF	931±54	3151±184	2126±95 <sup>o</sup>
TNF-α	412±28	2834±147	1242±36 <sup>*</sup>
IL-6	314±21	3904±214	1415±28 <sup>o</sup>
MMP-9	847±68	5171±324	3545±140 <sup>o</sup>

(image analysis for 200,000 pixels/range of intensity : 80-120)

Data mean±standard deviation ; \*, P<0.05 compared with CON.

NOR ; No treated group.

CON ; CIA elicited group.

SAM ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

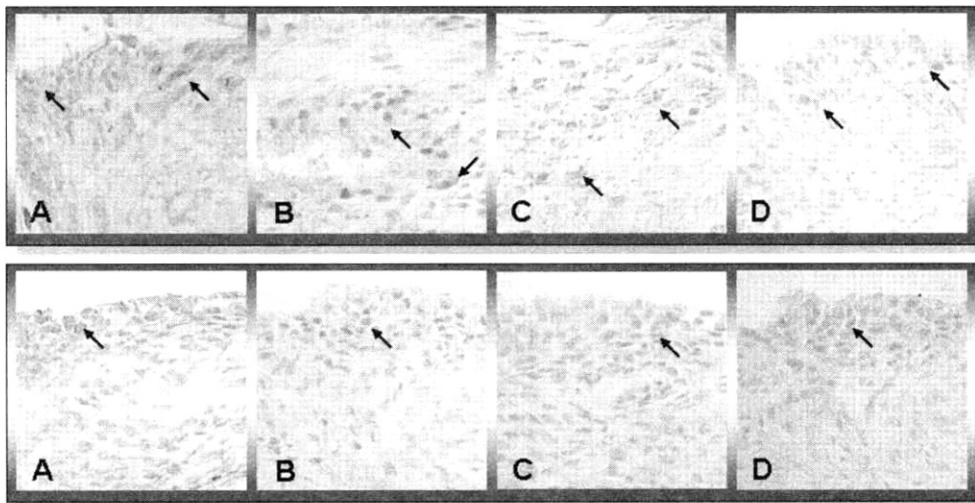


Fig. 4. Inhibition of arthritis related cytokine production by Nockyong herbal acupuncture(CON, Upper-box ; SAM, Lower-box)

A ; Suppression of MIF(MIF(arrow) immunohistochemistry, ×1000).

B ; Inhibition of TNF-α(arrow) production(TNF-α immunohistochemistry, ×1000).

C ; Inhibition of IL-6(arrow) production(IL-6 immunohistochemistry, ×1000).

D ; Inhibition of MMP-9(arrow) production(MMP-9 immunohistochemistry, ×1000).

CON ; CIA elicited group.

SAM ; Nockyong herbal acupuncture treated group after CIA elicitation.

다. 이런 IL-6 양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. IL-6 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 3,904±214(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 1,415±28(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05)(Table 4, Fig. 4-C).

#### 4) MMP-9 생성 억제

단백분해효소인 MMP-9의 양성반응세포의 분포는

대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 MMP-9 양성반응세포는 윤활관절막 침부표면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MMP-9 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 5,171±324(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 3,545±140(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05)(Table 4, Fig. 4-D).

## IV. 고찰

류마티스 관절염(RA)은 성인 인구의 1%에서 이환되어 있는 관절의 염증성 질환이다. 대부분의 환자에서 만성적인 경과를 취하며 관절의 파괴 및 변형이 발생하고 이로 인한 기능 장애와 삶의 질 감소 등을 초래한다<sup>22-24)</sup>. 류마티스 관절염이 초기 발생한 시점부터 면역 반응과 염증 반응, 관절의 손상이 시작되므로, 비가역적인 반응이 일어나기 이전인 초기부터 적절한 치료를 시작하는 것이 중요하다<sup>25)</sup>.

류마티스 관절염은 발병 원인이 불확실한데 반해, 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다. 요약해 보면, 윤활액내의 type II collagen 역가 증가<sup>26)</sup>, MIF의 증가<sup>27)</sup>, 전염증 cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ 의 증가<sup>28,29)</sup>, 염증성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화와 염증효소 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가<sup>30,31)</sup>, MMP의 증가<sup>32,33)</sup> 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역 반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류마티스 관절염은 발병 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 그래서 현재로서는 다양한 치료제들이 사용되고 있으나 여러 가지로 부적당한 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서는 류마티스 관절염을 痺症 혹은 歷節風의 개념으로 접근하고 있는데 《靈樞》<sup>34)</sup>에서 서술한 痺症 중 여러 관절들이 손상되고 상하 좌우로 이동하며 교체 발작하는 임상 증상과 성질에 근거하여 周痺 및 衆痺에 속하고, 病程이 길고 관절 腫痛이 오래도록 낫지 않는다는 점에서 頑痺에 속하며, 全身大關節이 腫痛하고 晝輕夜重하며 그 통증이 극심하다는 점에서 歷節風, 白虎歷節風, 痛風 등과 유사하다. 《金匱要略》<sup>81)</sup>은 최초로 “歷節風”을 頑固한 痺證으로 언급하면서 關節의 심한 통증과 不能屈伸 증상이 수반된다고 하여 류마티스 관절염과 매우 흡사한 질환으로 서술하고 있다. 隋代 巢元方은 《諸病源候論》<sup>35)</sup>에서 痺證을 風濕痺, 風痺, 風不仁, 風冷, 風四肢拘攣不得屈伸 등의 증후로 나누어 파악하였다.

鹿茸은 生精補髓 養血益陽 強筋健骨의 효능이 있어<sup>36)</sup> 예로부터 氣血을 補하고 關節과 筋骨에 영양을

공급하여 통증을 없애는 작용이 있는 것으로 알려져 있는데, 최근에는 동물실험을 통해 면역관계물질의 생성 촉진 효과 및 염증물질 생성 억제에 영향을 미친다는 연구보고가 다수 있다. 안<sup>18)</sup>은 녹용 약침액이 cathepsin S를 선택적으로 억제시켜 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환에 유효한 치료약물로 사용될 수 있음을 보였고, 김<sup>19)</sup>은 鹿茸약침이 IL-2, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 생산 억제를 보였고, 박<sup>20)</sup>은 녹용약침이 유리기체 거와 단백질분해활성을 통해 관절염치료에 효과적으로 쓰일 수 있음을 보이고 있다.

Collagen induced arthritis(CIA)는 인간의 류마티스 관절염과 유사한 실험적 모델로 잘 알려져 있다. CIA는 다수의 병리학적, 조직학적 그리고 면역학적 측면에서 RA와 유사한데, CIA의 소견은 염증성 세포 침윤, pannus 형성, 연골의 파괴와 골 괴사 등을 동반한 만성 활막염을 포함한다<sup>37)</sup>. 체액성 면역과 세포성 면역을 포함하는 type II collagen의 면역 기전은 RA의 발병 기전과 관련이 있고<sup>38)</sup>, 이로 인해 최근 류마티스 관절염의 실험 모델로 많이 사용되어지고 있다.

이와 같은 이론적 근거를 토대로 저자는 CIA 유발 생쥐 모델에서 鹿茸약침액을 이용하여 in vitro 상에서 관절염 관련 cytokine(MIF, TNF- $\alpha$ , MMP-9) 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였고, in vivo 상에서는 CIA에 유발된 생쥐의 陽陵泉(GB<sub>34</sub>)에 상응하는 부위에 녹용약침을 시술한 후 윤활관절막의 일반적인 형태, Th 1 및 Th 2 세포 분화, MIF, 전염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, 단백질분해효소인 MMP-9 등의 변화를 조사하였다.

MIF는 최초의 T 세포 유래 cytokine으로, 정상적으로 혈액 내에 일정한 농도로 존재하며 추가적으로 시상하부 전엽과 다양한 외부 자극에 의한 반응으로 활성화된 단핵구 또는 대식구에 의하여 분비된다. MIF는 대식구의 무작위적인 이동을 억제하며, 대식구 및 림프구의 면역 기능을 조절하는 중요한 역할을 하고, glucocorticoid의 면역 억제 및 항염증 작용에 대해 억제 조절 기능도 갖는다. 면역 및 염증 질환, 예를 들어 RA, 패혈증, 지연형 과민반응, 염증성 폐질환, 악성 종양, 그리고 동맥 경화에 이르기까지 다양한 질환에서 다양한 기능을 수행하는 cytokine으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 특히 류마티스 질환에서는 RA에서 MIF의 역할이 많이 연구되어 있다. RA 환자에서 MIF의 농도가 혈청, 활액, 활막의 섬유 세포에서 정상과 비교하여 증가되어 있으며, 질병의 활성도를 나타내는 C 반응 단백 수치와 양(+)의 상관관계를 보이고, 치료 전과 후를 비교

하였을 때 MIF가 감소하는 등 MIF가 RA의 임상적 발현 및 활성화에 중요한 역할을 한다<sup>40)</sup>. Onodera 등의 연구에서는 MMP의 합성을 증가시켜 관절의 파괴를 촉진한다고 하였다<sup>41)</sup>.

이러한 MIF 발현에 대하여 녹용약침액의 영향을 관찰한 결과 in vitro 실험에서 CIA 유발 DBA mouse의 윤활관절세포 내에서 PMA 자극시 발현되는 MIF mRNA 발현에 비교하여 녹용약침액 처리 후 0.4mg/ml에서 0.8%, 0.6mg/ml에서 5.7%, 0.8mg/ml에서 8.5%, 1.0mg/ml에서 30.3%가 감소하여 녹용약침액의 농도에 의존적으로 발현이 감소됨을 보였다.

MIF 생성 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해 in vivo 실험에서도 CIA 유발 mouse의 윤활관절막내 침부표면에서 나타나는 MIF 양성반응세포를 관찰하였는데 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 3,151±184(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 2,126±95(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05).

MIF의 발현 억제는 TNF, IL-1, IL-6, IL-8 유리 억제, PLA2, COX-2 상향 조절 차단으로 인한 PGE2 생합성 억제, MMP 합성 억제, apoptosis 유도도 이어져 RA 병인 기전의 최상위 단계까지 차단할 수 있을 것으로 보인다.

RA 윤활막과 혈청에서의 MIF 발현은 FLS와 macrophage에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비 증가를 일으키게 된다. TNF- $\alpha$ , chemokine 및 growth factor를 포함하여 많은 전염증성 사이토카인은 자가 면역 질환의 목표 장기에서 만성적인 염증반응을 일으킨다. Feldmann 등<sup>42)</sup>은 항 TNF- $\alpha$  항체가 류마티스성 관절염을 앓고 있는 환자의 관절에서 IL-1 및 다른 전염증성 사이토카인의 자발적인 생성을 억제할 수 있다는 근거가 종양 괴사인자를 이용한 치료방법에 대한 이론적 설명을 제시하였다. 관절염 실험동물 모델에게 anti-TNF- $\alpha$  mAb나 sTNF-R fusion protein을 전신적으로 투여했을 때 항염증과 관절 보호 작용을 나타낸 바 있다<sup>43)</sup>. RA 환자에 항 TNF- $\alpha$  항체를 투여한 경우 방사선 검사 상 관절 파괴의 진행이 억제됨을 보였고, TNF- $\alpha$ 는 활막 섬유아세포에 작용하여 세포 증식을 촉진하여 활막 과형성과 섬유화를 유도한다<sup>44)</sup>.

본 실험에서도 정상군에 비해 대조군에서는 부종에 의한 발 두께가 크게 증가하였는데, 7일째부터 28일까지 녹용 약침을 시술한 실험군에서 발 두께 증가의 억제 효과가 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보였고, 윤활관절막의 침부표면 두께 증가도 적었다.

TNF- $\alpha$ 는 IL-1, IL-6, IL-8 등과 같은 다른 염증성

cytokine의 조절에도 관여하여 항 TNF- $\alpha$  항체를 RA 활막조직에 처리한 경우 염증성 cytokine의 생성이 감소함을 볼 수 있다<sup>45)</sup>. 이러한 TNF- $\alpha$ 에 대해 녹용약침액의 영향을 관찰한 결과 in vitro 실험에서 CIA 유발 DBA mouse의 윤활관절세포 내에서 PMA 자극시 발현되는 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 비교하여 녹용약침액 처리 후 0.4mg/ml에서 7.7%, 0.6mg/ml에서 9.4%, 0.8mg/ml에서 16.2%, 1.0mg/ml에서 43.2%가 감소하여 녹용약침액의 농도에 의존적으로 발현이 감소됨을 보였다.

TNF- $\alpha$  생성 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해 in vivo 실험에서도 CIA 유발 mouse의 윤활관절막내 침부표면에서 나타나는 TNF- $\alpha$  양성반응세포를 관찰하였는데 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 2,834±147(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 1,242±36(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05).

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에서 MMP 생성을 유도하는데 MMP-9은 laminin과 type IV collagen을 선택적으로 분해하고 기저막을 파괴하여 염증관련 세포이주를 용이하게 한다. In vitro 실험에서 CIA mouse의 윤활관절세포 내에서 PMA 자극시 발현되는 MMP-9 mRNA 발현에 비교하여 녹용약침액 처리 후 0.4mg/ml에서 12.5%, 0.6mg/ml에서 21.1%, 0.8mg/ml에서 36.2%, 1.0mg/ml에서 53.2%가 감소하였고, in vivo 실험에서 mouse에 CIA을 유발하여 윤활관절막내 침부표면에서 나타나는 MMP-9 양성반응세포를 관찰하였는데 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 5,171±324(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 3,545±140(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05).

전염증 cytokine인 IL-6은 여러 가지 생물학적 활성을 가지는 다면적인 cytokine의 하나이다. IL-6의 생산이 조절되지 못해서 다량 생성되는 경우 류마티스 관절염과 같은 만성적 염증 질환에서 병적인 역할을 하는 것으로 보인다<sup>46)</sup>. IL-6 생성 억제에 대한 녹용약침의 효과를 조사하기 위해 in vivo 실험에서 CIA 유발 mouse의 윤활관절막내 침부표면에서 나타나는 IL-6 양성반응세포를 관찰하였는데 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 3,904±214(pixels)로 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 1,415±28(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05).

RA 환자의 경우 Th 1 활성화의 우세와 Th 2 활성화의 부족이 나타나고 이러한 불균형이 염증성 대식 세포와 B-cell의 활성화에 기여하게 된다. CD28과 IL-12는 Th 1 세포분화에 관여하고, IL-4는 Th 1 cell의 활성을 억제하여 IL-1 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 감소시키

고 IL-1 receptor antagonist의 발현을 증가시켜 염증 반응을 감소시킨다. 또한 IL-4는 Th 2 cell의 성장에서 중요한 역할을 하는 cytokine이다. Th 2 증재에 의해 면역은 염증 및 관절 손상을 경감시킨다<sup>47)</sup>.

본 실험에서도 CIA mouse의 윤활관절세포 내에서 Th 1 림프구 분화 억제제를 살펴보기 위해 CD28 양성 반응세포를 관찰하여 영상 분석한 결과 대조군은 정상군에 비해 3,280±142(pixels)로 증가한 반면, 실험군은 1,535±57(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었고 (p<0.05), IL-12 양성반응세포를 관찰하여 영상 분석한 결과 대조군은 정상군에 비해 3,343±142(pixels)로 증가한 반면, 실험군은 1,399±68(pixels)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05). 윤활관절세포 내에서 Th 2 림프구 분화 활성을 살펴보기 위해 IL-4 양성반응세포를 관찰하여 영상 분석한 결과 대조군은 정상군에 비해 1,727±57(pixels)로 증가하였고, 실험군은 3,392±118(pixels)로 유의성 있는 증가를 나타내었다(p<0.05).

본 실험은 CIA mouse의 무릎 윤활관절세포를 적출하여 biopsy로 직접 키운 cell을 이용하여 in vitro 실험을 함으로써 in vitro와 in vivo의 결과 동일성을 더욱 강하게 보여주고 있으며, 녹용약침이 전염증 cytokine들에 작용하여 류마티스 관절염의 최상위 단계에서 관련 cytokine의 생성을 억제하여 초기 류마티스 관절염의 진행을 차단하고 과도한 Th 1 세포 분화를 억제하고 Th 2 세포 분화를 증가시켜 RA로 기인된 조직 손상을 완화시키는 치료 효과를 보이는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

鹿茸藥鍼의 CIA 유발 류마티스성 관절염에 대한 치료효과를 조사하기 위하여 행해진 본 연구는 *in vitro* 상에서 녹용약침액의 류마티스 관절염 관련 cytokine (MIF, TNF- $\alpha$ , MMP-9) 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였고, *in vivo* 상에서는 CIA 유발 생쥐의 陽陵泉(GB<sub>34</sub>)에 상응하는 부위에 녹용약침을 시술한 후 윤활관절막의 일반적인 형태, Th 1 및 Th 2 세포 분화, MIF, 전염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, 단백질 분해효소인 MMP-9 등의 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 녹용약침액이 처리된 윤활관절세포에서는 류마티스

스 관절염 관련 cytokine인 MIF, TNF- $\alpha$ , MMP-9 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였다.

2. 녹용약침이 시술된 생쥐에서는 윤활관절막내 조직손상의 완화, Th 1 세포 분화 억제 및 Th 2 세포분화를 활성화하였고, 류마티스 관절염 관련 cytokine인 MIF, TNF- $\alpha$ , IL-6, MMP-9의 생성이 유의성 있게 감소하였다.

## VI. 참고문헌

1. Harria ED. Rheumatoid arthritis : pathophysiology and implications for therapy. N Eng J Med. 1990 ; 322 : 1277-89.
2. Schenck P, Schneider S, Miehke R, Prehm P. Synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 1995 ; 22 : 400-5.
3. 홍원식. 精校黃帝內經. 서울 : 東洋醫學研究院. 1989 : 86-7, 259, 305.
4. 張介賓. 景岳全書(上). 서울 : 대성문화사. 1988 : 229-35.
5. 丹波元堅. 雜病廣要. 서울 : 성보사. 1986 : 108-219.
6. 虞搏. 醫學正傳. 서울 : 성보사. 1986 : 212-8.
7. 陣貴延, 楊思澍 主編. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京 : 中國醫藥科技出版社. 1991 : 637-41.
8. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 大星文化社. 1993 : 12-4.
9. 장준혁, 김갑성, 김철호. 黃柏 및 威靈仙藥鍼이 Lipopolysaccharide 유발관절염의 IL-1 $\beta$  발현 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(1) : 512.
10. 이연경, 이병렬. 목방기약침액이 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(4) : 125-42.
11. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 생쥐의 LPS誘發關節炎의 細胞性 免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 287-318.
12. 정인태, 백용현, 박동석, 최도영. 봉독약침이 collagen 유발 관절염에 미치는 진통효과 및 그 기전 연구. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 99-108.
13. 이준호, 이병렬. 澤瀉藥鍼이 collagen으로 유발시킨關節炎에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 287-318.
14. 성은미, 이병렬. 赤芍藥鍼이關節炎에 미치는 實驗的 研究. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 221-50.

15. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 LPS 誘發 關節炎의 免疫反應에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 100-12.
16. 정경연, 김갑성, 윤종화. 牛黃·熊膽·麝香 複合藥劑 藥鍼刺戟이 LPS 유발 關節炎의 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 113-118.
17. 송인광, 이승덕, 김갑성. 쥐의 콜라겐 유도 관절염에 대한 유근피의 효과 및 기전. 대한침구학회지. 2007 ; 24(2) : 83-100.
18. 안형준, 김갑성. Inhibitory Effect of Deer Antler Aqua-acupuncture(DAA) on Cathepsin S Activity and Rheumatoid Arthritis in Rats. 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 104-16.
19. 김진규, 김갑성. Inhibitory effects of Cervi Pantotrichum Cornu herbal acupuncture on type 2 collagen-induced arthritis. 대한침구학회지. 2002 ; 19(6) : 155-70.
20. 박상동, 김민정, 이아람, 장준혁, 김경호. Effect of Cervi Pantotrichum Cornu Herbal acupuncture on protease activities, antioxidant in Rheumatoid arthritis rats. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 51-64.
21. 김무진, 윤종화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 膝關節炎의 鍼灸治療에 관한 문헌고찰. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 191-201.
22. Pincus T, Callahan LF. What is the nature history of rheumatoid arthritis? Rheum Dis Clin North Am. 1993 ; 19 : 123-51.
23. Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis : result after 20 years. Lancet. 1987 ; 1 : 1108-11.
24. Wolfe F. The determination and measurement of functional disability in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2002 ; 4 : 11-5.
25. Tak PP, Smeets TJ, Dahn MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R et al. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. Arthritis Rheum. 1997 ; 40 : 217-25.
26. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
27. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. J. Internal medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
28. Leech M, Metz CN, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis : evidence for pro-inflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum. 1999 ; 42 : 1601-8.
29. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-440.
30. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44(6) : 1273-80.
31. Yasmina J, Catalina A, Carmen M, Alicia A, Irene G, Florencia R, Rosa P, Javier L. Protective effect of vasoactive intestinal peptiden bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. & Therapy. 2005 ; 7 : 1034-45.
32. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases : role in arthritis. Front Biosci. 2006 ; 11 : 529-43.
33. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. J. Biol chem. 2000 ; 275 : 444-50.
34. 홍원식. 校勘直譯 黃帝內經靈樞. 서울 : 傳統文化研究院. 1994 : 234-7.
35. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 51.
36. 李梴. 醫學入門. 臺北 : 臺聯國風出版社. 1968 : 110, 226, 400.
37. Remmers EF, Joe B, Griffiths MM, Dobbins DE, Dracheva SV, Hashiramoto A, Furuya T, Salstrom JL, Wang J, Gulko PS, Cannon GW, Wilder RL. Modulation of multiple experimental arthritis models by collagen-induced arthritis quantitative

- trait loci isolated in congenic rat lines : different effects of non-major histocompatibility complex quantitative trait loci in males and females. *Arthritis Rheum.* 2002 ; 46(8) : 2225-34.
38. Lu S, Carlsen S, Hansson AS, Holmdahl R. Immunization of rats with homologous type XI collagen leads to chronic and relapsing arthritis with different genetics and joint pathology than arthritis induced with homologous type II collagen. *J Autoimmun.* 2002 ; 18(3) : 199-211.
39. Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichyama H et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the express of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients : common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2004 ; 50 : 1437-47.
40. Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis : clinical correlations. *Rheumatology(Oxford).* 2002 ; 41 : 558-62.
41. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinase in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 444-50.
42. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis : what have we learned? *Annu REV Immunol.* 2001 ; 19 : 163-96.
43. Feldmann M. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis : what can we learn about chronic disease? *Novartis Found Symp.* 2004 ; 256 : 53-69.
44. Youn J, Kim HY, Park JH et al. Regulation of TNF alpha-mediated hyperplasia through TNF receptors, TRAFs, and NF-kappaB in synovocytes obtained from patient with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2002 ; 83 : 85-93.
45. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 1995 ; 6 : 225-30.
46. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1/erythroid potentiating activity(TIMP-1/EPA). *J Biol Chem.* 1991 ; 266 : 2017-20.
47. van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis may require a concerted action of Th 2 cytokines. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002 ; 3 : 1011-16.