

원저

足三里 紅花藥鍼처치가 Collagen으로 유발한 생쥐의 관절염 모델에 미치는 영향

박기홍 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with *Carthami Flos* at *Joksamni*(ST₃₆) on Collagen-induced Arthritis in Mice

Park Ki-hong and Lee Hyun

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

Objectives : The purpose of this study is to observe the effects of *Carthami Flos* herbal-acupuncture (CF-HA) at *Joksamni*(ST₃₆) on arthritis in mice induced by Collagen II.

Methods : The author performed several experimental items, including arthritis evaluation, change in weight, spleen size and stenosis rate, change in cytokine level, IgG, IgM and anti-collagen II, change of immunocyte count and histological change of the CIA mouse joint. Conclusions are as follows:

Results :

1. In the CF-HA, the arthritis index and rate and the incidence of arthritis were decreased as the experiment proceeded.
2. In the CF-HA, spleen swell and stenosis, joint edema and change were decreased.
3. In the CF-HA, the level of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ in blood serum were significantly decreased.
4. In the CF-HA, the level of IgG, IgM and anti-collagen II were decreased.
5. In the CF-HA, IFN- γ , IFN- γ /IL-4, IL-10 of the culture fluid was decreased.
6. In the CF-HA, the cell rate of CD3e⁺ and CD45R⁺, CD4⁺ and CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺ in spleen was similar to the cell rate of the normal group.
7. In the CF-HA, the cell rate of CD4⁺/CD25⁺, CD45R⁺/CD69⁺ in a lymph node was decreased as in the normal group.
8. In the CF-HA, the cell rate of CD3⁺/CD69⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ in joints was decreased as in the normal group.

· 접수 : 2007년 10월 25일 · 수정 : 2007년 11월 14일 · 채택 : 2007년 11월 15일
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 백석동 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 041-521-7579 E-mail : lh2000@hanmir.com

9. In the CF-HA, the cartilage destruction and the inflammation cell growth in the H&E stain were decreased. The collagen fiber in the M&T stain were less destructed, therefore the result was similar to the normal group.

Conclusions : These results suggest that CH-HA at ST₃₆ has an effect in controlling immune reaction and suppressing inflammation in rheumatoid arthritis therefore, the continuous flow of the following study is expected.

Key words : Rheumatoid arthritis(RA), Collagen - induced Arthritis(CIA), Carthami Flos, Herbal-acupuncture, Joksamni(ST₃₆)

I. 서론

류마토이드 관절염은 韓醫學의으로는 痺症, 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 있고, 原因으로는 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으로 發生한다^{1,2)}. 그 증상으로는 만성적인 염증성 질환의 하나로, 활막의 만성적 비대와 염증반응을 초래하여 관절액이 증가되어 주위조직의 괴사, 關節의 浮腫과 疼痛이 초래되며, 2차로 발생된 육아조직에 의하여 관절경직, 운동제한 및 변형 등을 일으키는 疾患이다³⁾.

病因은 연쇄상구균, virus 등의 感染, 호르몬의 不調和, vitamin 缺乏, 遺傳 및 自家免疫反應 등으로 報告되고 있으며, 특히 最近에는 自家免疫說이 主된 病機로 認識되고 있다^{4,5)}.

류마토이드 關節炎의 治療에 대한 연구로는 NSAIDs, steroid, DMARD(disease modifying anti-rheumatic drag), immunosuppressive agent, BRM(biological response modifier) 등이 이용되고 있고⁶⁾, 治療方法은 炎症誘發 싸이토키인의 拮抗物質을 이용하는 방법으로 약제는 interleukin-1 수용체의 antagonist와 종양괴사인자의 길항물질로서 soluble TNF- α 수용체, 그리고 항 TNF- α 抗體가 있으며 이외에도 유전자 治療가 기대되고 있다⁷⁾.

韓醫學에서는 鍼, 灸, 電鍼, 蜂鍼, 藥鍼 등의 다양한 연구가 이루어져 왔다^{8,9)}. 活血通經하고 散瘀止痛의 效能이 있어 임상에서 疼痛, 跌撲損傷, 急慢性 筋肉勞傷 등의 질환에 多用하고 있는 紅花에 관한 연구로는 혈전증^{10,11)}, 뇌의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성억제를 방지¹²⁾, 요

통치료¹³⁾, CCl₄로 인한 간손상¹⁴⁾, 조혈작용¹⁵⁾에 효과가 있음을 보고한 바가 있었으나 류마토이드 關節炎과 관련하여 紅花藥鍼을 이용한 研究는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 著者는 collagen type II(CII)로 關節炎이 유발된 생쥐의 足三趾에 紅花藥鍼을 시술하여 관절염 지수 및 발병률, 관절의 부종 및 외형변화, 비장의 크기 및 외형변화, 체중의 변화, 혈청 및 비장세포배양액에서의 염증관련 cytokine, 면역글로불린 및 anti-collagen II의 수치, 비장과 림프절 및 관절내의 면역세포, 관절의 조직학적 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 紅花(*Carthami Flos*; 이하 CF로 표기)는 대전대학교 부속대전한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2) 동물

동물은 6~7주령의 수컷 DBA/1J 생쥐 40마리를 Slc (Japan)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2°C를 유지하여 1주일간 실험실환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 방법

1) 藥鍼液의 제조

분쇄기를 이용해서 紅花 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 원형 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 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 여과 하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 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 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후 멸균하였다. 멸균된 농축액에 phosphate buffer saline(PBS)을 가하여 1%로 희석하여 藥鍼液으로 사용하였다.

2) 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 하였다¹⁶⁾.

DBA/1J 생쥐 8마리씩을 한 群으로 하여 normal群, control群, saline群, N.P.(needle prick)群, 紅花藥鍼(Carthami Flos Herbal-acupuncture, CF-HA)群의 5群으로 나누고, normal群을 제외한 각 群에 CII를 2次(7일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1ml(CII 100 μ g)씩 꼬리基部에 접종하였고 12주째에 sacrifice시켰다.

3) 취혈 및 약침처치

DBA/1J 생쥐 8마리씩을 한 群으로 하여 normal群, control群, saline群, N.P.群, CF-HA群의 5群으로 나누고, 골도분춘법에 의거하여 생쥐의 우측 뒷다리에 서 인체의 足三里(Joksamni ; ST₃₆)에 상응하는 부위를 취하였다.

Normal : 6주령의 DBA/1J mouse

Control : CII의 접종을 실시한 群

Saline : CII의 접종을 실시 후, saline 0.2ml를 주 3회 右側 足三里(ST₃₆)에 주입한 群

N.P. : CII의 접종을 실시 후, 주 3회 右側 足三里(ST₃₆)에 26gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 刺入한 群

CF-HA : CII 접종 이후부터 右側 足三里(ST₃₆)에 1%의 CF-HAS 0.2ml를 주 3회 주입한 群

4) 관절염 평가

(1) 관절염 지수(arthritis index) 평가

CII 2차 접종 1주일 후부터 1주일 간격으로 실험동물의 다리를 관찰하여 關節炎 誘發 정도를 기록하였다. 아래의 기준을 바탕으로 關節炎 정도를 관찰하여 관절염 지수(AI)를 계산하였다¹⁶⁾.

Degree 0 - no change

Degree 1 - mild swelling in ankle or redness in foot

Degree 2 - mild swelling and inflammation and redness from ankle to mid foot

Degree 3 - gross swelling and inflammation of entire foot

Degree 4 - swelling and inflammation of entire foot including toes

AI = Sum of the arthritis score in the four limbs of each mouse within the group/The number of mouse within the group

(2) 관절염 발병률

CII 접종으로 關節炎을 유도한 이후 실험동물의 양쪽 뒷다리 關節을 관찰하여, 관절염 점수가 한 다리 이상에서 degree 3 이상이거나, 두 다리 이상에서 degree 2 이상인 실험동물의 개체수를 확인하여 기록하였다.

(3) 關節의 부종

유도된 關節炎의 심화도를 객관적으로 평가하기 위하여 2차 접종을 실시한 뒤 10일 간격으로 micrometer (측미계, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 생쥐 다리 발목관절의 浮腫 정도를 확인하였으며, 1회 실시에 3번의 측정을 통해 평균값을 기록하였다.

5) 몸무게 측정

CII 2차 접종 후부터 실험 종료 때까지 10일 간격으로 각 實驗群의 DBA/1J 생쥐의 몸무게 변화를 관찰

하여 關節炎 유발 정도에 따른 몸무게의 변화를 기록하였다.

6) 비장의 외형 변화 관찰 및 장기 유착률 측정

실험 종료 시, DBA/1J의 臟器 적출을 실시할 때 비장의 외형 변화를 사진촬영을 통해 기록을 남겼으며, 복강내 臟器의 유착 정도를 확인하고 개체 수를 기록하여 유착의 발생 정도를 확인 하였다.

7) 관절의 외형변화 관찰

실험 기간동안, 관절염으로 인한 각 실험군의 DBA/1J mouse 발목 관절 부위의 외형변화를 확인하고, 사진 촬영을 통해 기록을 남겼다.

8) 비장세포 채취 및 배양

CIA mouse 비장조직을 적출하여 4℃에 보관했던 phosphate buffer saline(PBS)로 3회 세척한 후, 40µm nylon mesh에 갈아서 비장세포를 얻었다. 비장세포를 5% fetal bovine serum과 antibiotics(penicillin 100U/ml, streptomycin 100µg/ml)가 포함된 RPMI 1640 medium(Sigma, USA)에 넣어서 5×10⁶cells/ml 농도로 맞추고 50µg/ml CII 또는 anti-CD3/CD28 항체가 coating되어 있는 96well plate에 분주하여 37℃ CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리 하여 상층액만 분리하였고 상층액 중에 분비된 cytokines을 ELISA로 측정하였다.

9) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

ELISAKit를 사용하여, 생쥐에서 분리한 serum 및 spleen cell culture supernatant에서 각 cytokine과 면역 글로불린, anti-collagen II 항체를 측정하였다. 항 cytokine 혹은 면역 글로불린과 anti-collagen II 항체가 코팅된 96well plate에 serum을 가하여 반응시킨 후 4번 세척하고, 다시 biotin이 표식된 항cytokine 항체를 가하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 streptavidin horseradish peroxidase(streptavidin-HRP)를 가하고 ELISA-reader를 이용하여 optical density (O.D.) 측정하였다.

10) Flow cytometry

(1) 비장 및 림프절 내 세포 분석

각 群에서 절취한 비장 및 lymph node에서 세포를

분리하여 표식항체를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다¹⁷⁾.

(2) 관절 내 면역 세포 분석

생쥐에서 분리해 낸 무릎 關節을 잘게 절단한 후 collagenase를 가하고 배양하여 분리해 낸 세포에 표식항체를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다.

11) 조직학적 분석

DBA/1J 생쥐의 무릎 關節 부위를 취하여 cryotome을 이용하여 절편한 후, Hematoxylin and eosin염색과 Masson's trichrome 염색을 하고, 400배율로 현미경에서 관찰을 하였으며, 사진 촬영을 실시하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 結果에 대하여 ANOVA and Bonferroni-type multiple t-test(parametric), Ver 1.1로 分析하여 p값을 구했다. 각 實驗群을 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있다고 판정하였다. Normal군과 다른 實驗群간의 유의성 표기는 생략하였다.

III. 성 적

1. 관절염에 미치는 영향

1) 관절염 지수(AI)

관절염 지수(AI)는 1차 접종을 시점으로 실험방법에 기재된 관절염 지수의 기준에 맞춰 평가하였다¹⁶⁾. Control群에서는 2차 접종 후 관절염 지수가 급격하게 증가하였다. 紅花藥鍼群의 관절염 지수(AI)는 2차 접종을 실시한 후 초기에는 control群보다 빠르게 증가하다가 시간이 지나면서 관절염 지수가 점차적으로 지연되는 경향을 나타내어 control群과 점진적인 차이를 나타내었다(Fig. 1).

2) 關節炎 발병률

關節炎을 유도한 이후 실험동물의 네 다리 關節을 관찰하여, 관절염 점수가 한 다리 이상에서 degree 3 이상이거나, 두 다리 이상에서 degree 2 이상인 실험동물의 개체수를 도표화하여 정리 하였다. Control群은 시간이 지나면서 關節炎 발병률이 점차적으로 증

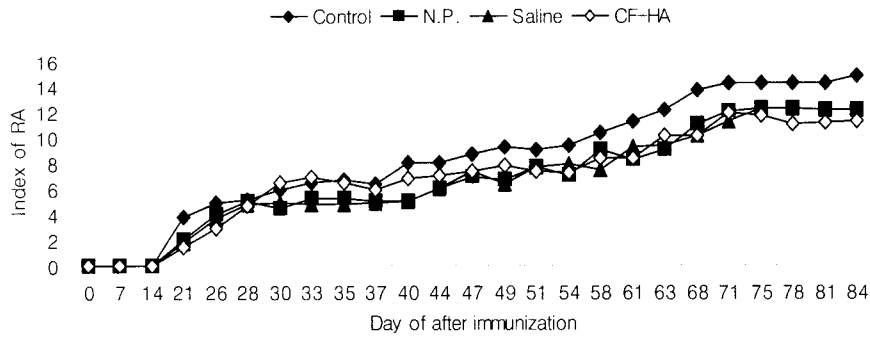


Fig. 1. The effect of CF-HA on the collagen induced arthritis index

Table 1. Arthritis Incidence

Days	Arthritis incidence							
	Control(n=8)		N.P.(n=8)		Saline(n=8)		CF-HA(n=8)	
	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left
26 day	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8
28 day	0/8	2/8	0/8	2/8	1/8	2/8	2/8	2/8
30 day	0/8	2/8	2/8	1/8	1/8	2/8	2/8	2/8
33 day	1/8	3/8	2/8	2/8	1/8	2/8	1/8	2/8
35 day	3/8	3/8	2/8	1/8	1/8	1/8	2/8	2/8
37 day	3/8	3/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	3/8
40 day	1/8	4/8	2/8	6/8	2/8	3/8	2/8	2/8
47 day	3/8	4/8	2/8	5/8	2/8	4/8	2/8	2/8
49 day	4/8	5/8	2/8	5/8	1/8	4/8	2/8	2/8
51 day	4/8	3/8	1/8	4/8	1/8	5/8	2/8	2/8
54 day	4/8	4/8	2/8	4/8	5/8	4/8	3/8	3/8
58 day	4/8	5/8	4/8	5/8	4/8	5/8	2/8	3/8
61 day	6/8	4/8	3/8	4/8	2/8	6/8	2/8	4/8
63 day	4/8	5/8	2/8	5/8	2/8	6/8	3/8	4/8
68 day	5/8	6/8	4/8	6/8	2/8	7/8	3/8	4/8
71 day	6/8	6/8	5/8	7/8	2/8	6/8	2/8	7/8
75 day	7/8	8/8	8/8	6/8	5/8	7/8	4/8	8/8
84 day	8/8	8/8	7/8	7/8	7/8	7/8	4/8	8/8

가되는 것을 확인 할 수 있었다. 紅花藥鍼群은 30일을 전후로 하여 關節炎의 반응이 심화되었으나, 실험 종료 시에는 control群에 비하여 關節炎 발병률이 감소되어 있었다. 紅花藥鍼群에서 약침을 처치한 右側 다리에서 左側 다리에 비해 關節炎 발병률이 낮게 유지되었다(Table 1).

3) 關節의 부종

關節炎의 심화도를 객관적으로 평가하기 위하여 micrometer(측미계, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 실험동물의 발목 관절의 浮腫 정도를 측정하였다. Normal群을 제외한 모든 群에서 關節의 부종이 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 紅花藥鍼群에서는 실험 초기에는 관절의 부종이 control과 유사하게 나타났으나, 실험 중반에는 점차적으로 부종이 감소하는 경향을

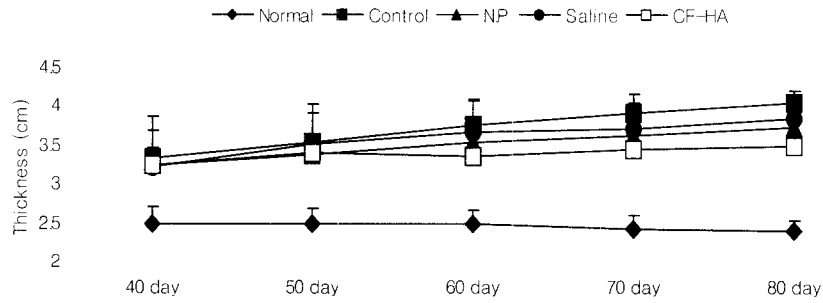


Fig. 2. The effect of CF-HA on CIA mouse joint edema

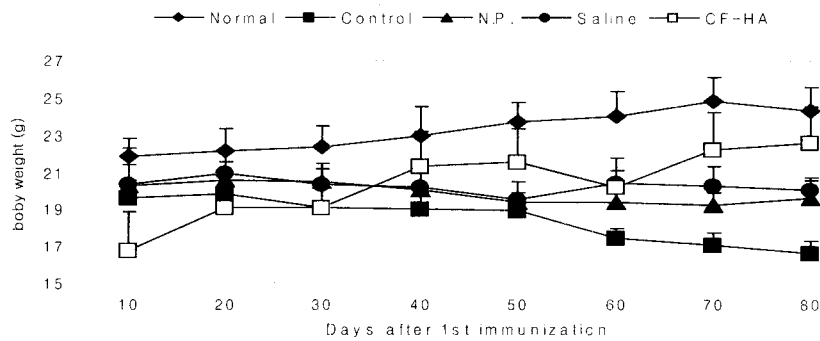


Fig. 3. The effect of CF-HA on CIA mouse body weight

Table 2. The Rate of Adhesion from Arthritis by Bovine Type II Collagen(CII)

	Normal	Control	N.P.	Saline	ChF-HA
Adhesion rate	0 %	87.5 %	75 %	87.5 %	62.5 %

보였지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

2. 몸무게 변화에 미치는 영향

關節炎의 진행에 따른 실험동물의 몸무게 변화를 확인하였다. 2차 접종 후 control群의 몸무게는 점차로 감소하는 경향을 나타냈으며, N.P.群과 saline群에서도 몸무게가 감소하는 경향을 확인하였다. 紅花藥鍼群에서는 6주째를 제외하고 몸무게가 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 관절염 발병에 따른 몸무게의 저하가 나타나지 않았다(Fig. 3).

3. 비장의 외형 변화에 미치는 영향

關節炎 발병에 따른 비장조직의 외형적 변화를 관찰하였다. Normal群에 비하여 control群에서는 비장

이 약간 증대되어 있었으며, 특히 비장이 위치한 부위의 기관들이 유착되어 있었다. 이러한 경향은 紅花藥鍼群에서도 나타났으나, 그 유착의 발생빈도는 control群에 비하여 감소한 것을 확인 하였다(Table 2).

4. 關節의 외형 변화에 미치는 영향

關節炎의 유도에 따라 나타나는 關節의 부종정도 및 외형 변화를 확인 하였다. 외관상 control群에서 normal群에 비하여 관절부위의 부종이 심해진 것을 확인할 수 있었으며, 더불어 발가락 關節이 휘어지는 경우도 있었다. 이러한 부종 및 외형 변화는 개체마다 약간의 차이가 있었다. N.P.群과 saline群 역시 부종과 關節의 변형을 확인 할 수 있었다. 紅花藥鍼群의 관절 부위 부종 및 관절변형은 완화되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

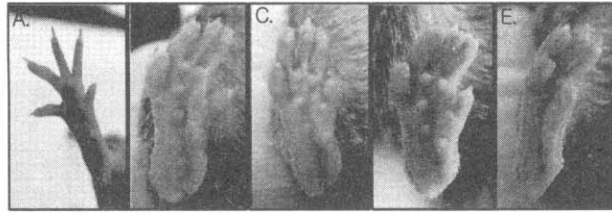


Fig. 4. The effect of CF-HA on CIA mouse hind limb

Table 3. The Effect of CF-HA on the Cytokine Levels in CIA Mouse Serum

Parameter	Normal	Control	N.P.	Saline	CF-HA
IL-1 β	0.18 ± 0.014	0.75 $\pm 0.198^{***}$	0.72 $\pm 0.148^{***}$	0.568 $\pm 0.086^{**}$	0.351 $\pm 0.028^{PPP\#\#\$}$
IL-6	0.12 ± 0.019	0.307 $\pm 0.005^{***}$	0.218 $\pm 0.012^{***PPP}$	0.241 $\pm 0.016^{***PPP}$	0.125 $\pm 0.016^{PPP\#\#\$}$
TNF- α	0.112 ± 0.037	1.853 $\pm 0.094^{***}$	1.068 $\pm 0.101^{***PPP}$	0.992 $\pm 0.087^{***PPP}$	1.183 $\pm 0.188^{***PPP}$
IFN- γ	0.838 ± 0.165	1.878 $\pm 0.044^{***}$	1.123 $\pm 0.171^{PP}$	1.128 $\pm 0.31^{PP}$	1.392 $\pm 0.397^{**P}$

*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05 vs normal group by ANOVA test.
 PPP : P<0.001, PP : P<0.01 P : P<0.05 vs control group by ANOVA test.
 # : P<0.05 vs N.P. group by ANOVA test.
 §§ : P<0.01 vs saline group by ANOVA test.

5. Serum cytokine level에 미치는 영향

실험동물의 血清에서 關節炎에 관련하여 나타나는 사이토카인의 생성 정도를 ELISA를 통하여 확인하였다(Table 3).

1) IL-1 β

실험동물의 血清에서 IL-1 β 의 생성정도를 ELISA를 이용하여 확인하였다. Control群은 normal群에 비하여 IL-1 β 의 농도가 증가하였으며, 紅花藥鍼群에서는 control群에 비하여 IL-1 β 의 농도가 유의성 있게 감소하였다.

2) IL-6

실험동물의 血清(serum)에서 IL-6의 생성정도를 ELISA를 이용하여 확인하였다. Normal群에 비해서 모든 群에서 IL-6의 생성이 증가하였다. 紅花藥鍼群은 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 IL-6의 생성이 유의성 있게 감소하였다.

3) TNF- α

실험동물의 血液을 분리하여 얻은 血清(serum)에서 TNF- α 의 생성정도를 ELISA를 이용하여 확인하였다. Normal群에 비해서 모든 群에서 TNF- α 생성이 증가하였고 紅花藥鍼群은 control群에 비해서 TNF- α 의 농도가 유의성 있게 감소하였다.

4) IFN- γ

실험동물의 血清에서 IFN- γ 의 생성정도를 ELISA를 이용하여 확인하였다. Normal群에 비해 control群에서 IFN- γ 가 증가하였으며 紅花藥鍼群에서 control群에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

6. Serum Antibody level 에 미치는 영향

1) IgG

실험동물의 血液을 2주에 한 번씩 채취하여 혈청 IgG의 농도를 확인 하였다. Normal群에 비해서 모든

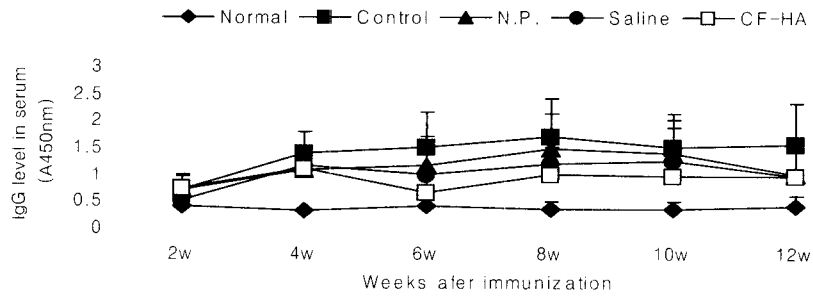


Fig. 5. The level of IgG in CIA mouse serum

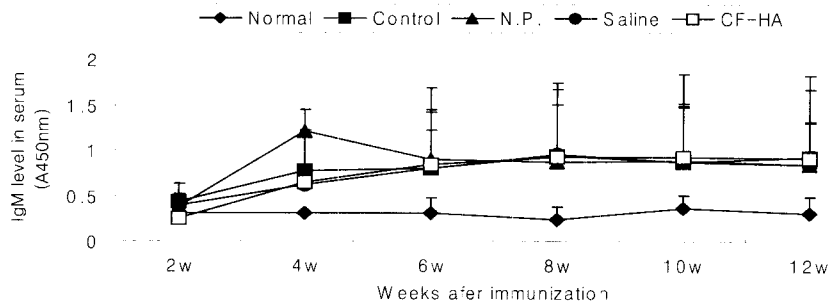


Fig. 6. The level of IgM in CIA mouse serum

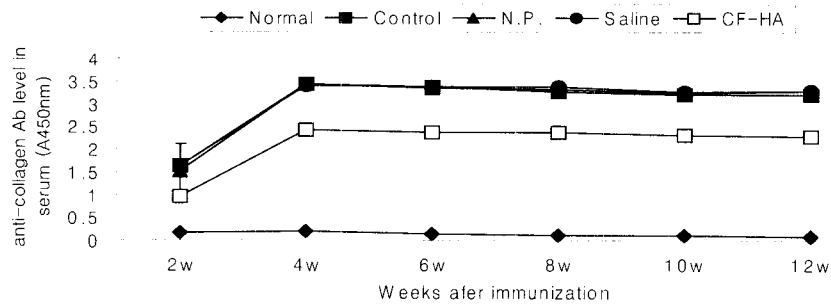


Fig. 7. The level of anti-collagen II in CIA mouse serum

群은 IgG의 생성이 점차적으로 증가되었다. 紅花藥鍼群은 control群에 비하여 血清 IgG 농도가 실험 시작 4주째에 혈청 IgG 농도가 가장 높았으며, 이후 감소하여 control群에 비하여 낮은 농도로 유지되었다(Fig. 5).

2) IgM

실험동물의 血液을 2주에 한 번씩 採取하여 혈청 IgM의 농도를 ELISA를 이용하여 확인 하였다. Normal群에 비해서 모든 群에서 IgM의 생성이 점진적으로 증가되었으며, 紅花藥鍼群에서는 실험 후반부에 혈청 IgM의 농도가 control 群에 비하여 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

3) Anti-collagen II

실험동물의 血液을 2주에 한 번씩 채취하여 혈청 내 anti-collagen II의 농도를 확인 하였다. Normal群에 비하여 모든 實驗群의 anti-collagen II의 농도가 증가되었다. 紅花藥鍼群은 control群, saline群 및 N. P.群에 비해 anti-collagen II의 농도가 감소되었다(Fig. 7).

7. 비장세포 배양액에서의 cytokine level에 미치는 영향

실험동물의 비장 조직에서 세포를 분리하여 關節炎

Table 4. The Effect of CF-HA on the Cytokine Levels of CIA Mouse Spleen Cell Culture

Parameter	Normal	Control	N.P.	Saline	CF-HA
IFN- γ	0.16 ± 0.14	0.956 $\pm 0.042^{***}$	1.017 $\pm 0.026^{***}$	0.923 $\pm 0.031^{***}$	0.107 $\pm 0.001^{***\#\#\#\#\#}$
IL-4	0.112 ± 0.012	0.377 $\pm 0.018^{**}$	0.484 $\pm 0.001^{***}$	0.47 $\pm 0.022^{***}$	0.477 $\pm 0.078^{***}$
IL-10	0.04 ± 0.005	1.122 $\pm 0.081^{***}$	0.713 $\pm 0.062^{***\#\#\#}$	0.551 $\pm 0.059^{***\#\#\#}$	0.148 $\pm 0.051^{***\#\#\#\#\#}$

*** : P<0.001 vs normal group by ANOVA test.
 $\#\#\#$: P<0.001 vs control group by ANOVA test.
 $\#\#\#$: P<0.001 vs N.P. group by ANOVA test.
 $\#\#\#\#\#$: P<0.001, $\#\#\#$: P<0.01 vs saline group by ANOVA test.-HA.

발병에 의한 면역작용을 일으키는 사이토카인의 생성 정도를 ELISA를 통하여 확인하였다(Table 4).

1) IFN- γ

關節炎이 유도된 생쥐의 비장세포 배양액(spleen cell culture supernatant)에서의 IFN- γ 의 농도를 확인하였다. Normal群에 비해 control群, N.P군, saline 군에서 IFN- γ 가 증가되었으며, 紅花藥鍼群의 비장세포 배양액내 IFN- γ 는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

2) IL-4

關節炎이 유도된 생쥐의 비장세포를 채취하여 *in vitro*에서 배양하며 anti-CD3/CD28로 활성화시킨 후 IL-4의 생성량을 확인 하였다. 紅花藥鍼群의 비장세포 배양액내 IL-4 농도는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 증가하였다.

3) IFN- γ /IL-4 ratio

關節炎이 유도된 생쥐의 비장세포를 채취하여 *in vitro*에서 배양하여, anti-CD3/CD28로 활성화시킨 후, IFN- γ /IL-4 비율을 계산하였다. IFN- γ /IL-4 비율은 normal群에 비하여 control群에서 증가하였으며, 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

4) IL-10

關節炎이 유도된(collagen-induced arthritis) 생쥐의 비장세포를 채취하여 *in vitro*에서 배양하며 anti-

CD3/CD28로 활성화시킨 후 IL-10의 생성량을 ELISA로 확인 하였다. IL-10은 normal群에 비해 모든 群에서 증가를 보였으나, 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

8. 비장 내 면역세포에 미치는 영향

1) Total cell count in spleen

비장세포를 분리한 뒤, 비장 내 총세포수를 확인하였다. 紅花藥鍼群에서control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 비장 내 총세포수가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

2) Ratio of CD3e⁺ cells to CD45R⁺ (B220)⁺ cells

비장조직 내에 활성화된 T세포와 활성화된 B세포의 비율을 알아보기 위하여 CD3e⁺와 CD45R⁺의 세포

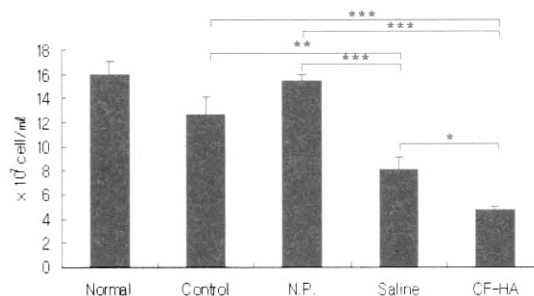


Fig. 8. The effect of CF-HA on total cell count in CIA mouse spleen

***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 by ANOVA test.

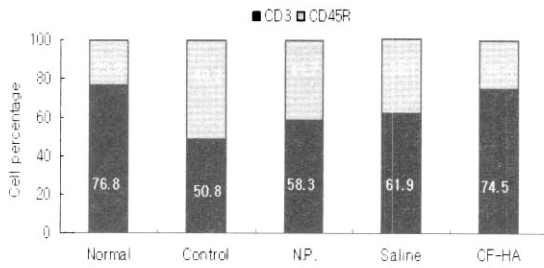


Fig. 9. The effect of CF-HA on ratio of CD3⁺ cells to CD45R⁺ cells in CIA mouse spleen

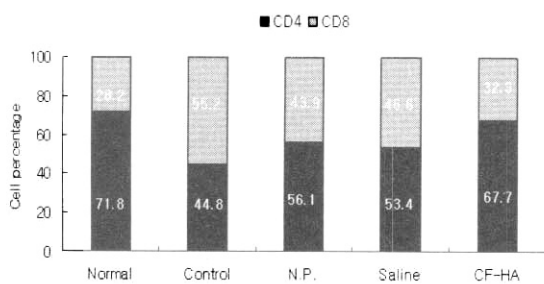


Fig. 10. The effect of CF-HA on ratio of CD4⁺ cells to CD8⁺ cells in CIA mouse spleen

비율을 관찰하였다. Control群에서는 normal群에 비하여 CD3e⁺세포에 대한 CD45R⁺의 비율이 증가하였다. 紅花藥鍼群은 CD45R⁺세포의 비율이 줄어, CD3e⁺세포에 대한 CD45R⁺의 비율이 normal群과 유사한 비율로 변화하였다(Fig. 9).

3) Ratio of CD4⁺ cells to CD8⁺ cells

비장조직 내의 보조 T세포와 세포독성 T세포의 비율을 알아보기 위하여 CD4⁺와 CD8⁺의 세포의 비율을 관찰하였다. Control群의 비장조직 내 CD4⁺세포 비율은 normal群에 비하여 감소하였고, 상대적으로 CD8⁺세포의 비율은 증가하였다. 紅花藥鍼群에서는 CD4⁺와 CD8⁺의 세포의 비율이 normal群에 유사하게 회복되었다(Fig. 10).

4) CD4⁺/CD25⁺ cell population

비장 내 면역조절 T세포의 변화를 관찰하기 위하여 CD4⁺와 CD25⁺의 표적항체에 동시에 반응하는 세포의 비율을 측정하였다. Normal群에 비하여 saline群 및 control群의 CD4⁺/CD25⁺ 세포가 증가한 것을 확인하였으나 紅花藥鍼群에서는 CD4⁺/CD25⁺ 세포가 현저하게 감소하였다(Fig. 11).

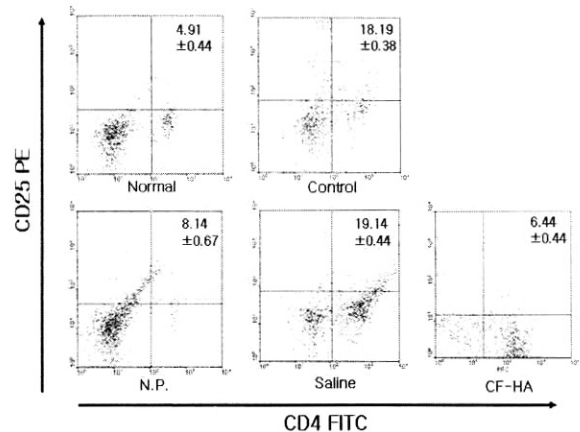


Fig. 11. The effect of CF-HA on CD4⁺CD25⁺ cell population in CIA mouse spleen

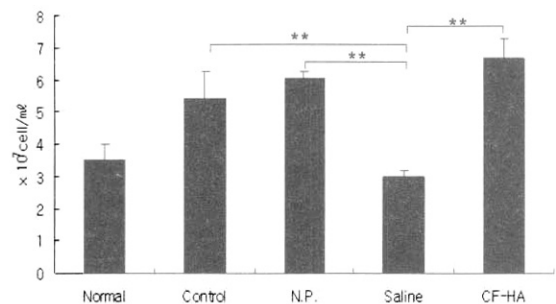


Fig. 12. The effect of CF-HA on total cell count in CIA mouse lymph node

9. 림프절 내 면역세포에 미치는 영향

1) Total cell count in lymph node

림프절 내 총세포수를 확인하였다. Normal群에 비하여 control群에서 림프절 내 총세포수가 증가하였고, 紅花藥鍼群에서는 control群에 비해 증가하였다(Fig. 12).

2) CD4⁺/CD25⁺ cell population

림프절 내 면역조절 T세포의 변화를 관찰하기 위하여 CD4⁺와 CD25⁺의 표적항체에 동시에 반응하는 세포의 비율을 확인하였다. 모든 實驗群은 normal群에 비하여 CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율이 증가하였으나 紅花藥鍼群에서 control群에 비해서 CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율이 현저히 감소되었다(Fig. 13).

3) CD45R⁺/CD69⁺ cell population

림프절 내 B세포들 중에서 활성화된 B세포들의 변

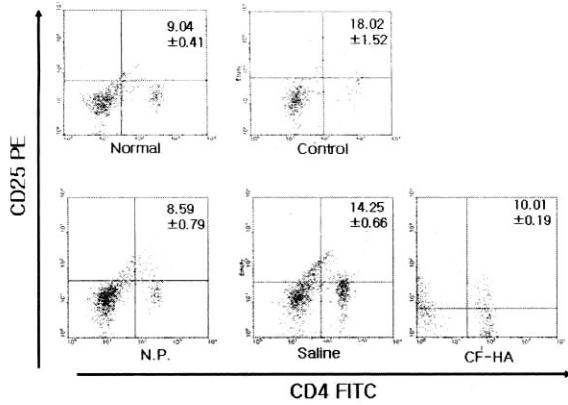


Fig. 13. The effect of CF-HA on CD4⁺/CD25⁺ cell population in CIA mouse lymph node

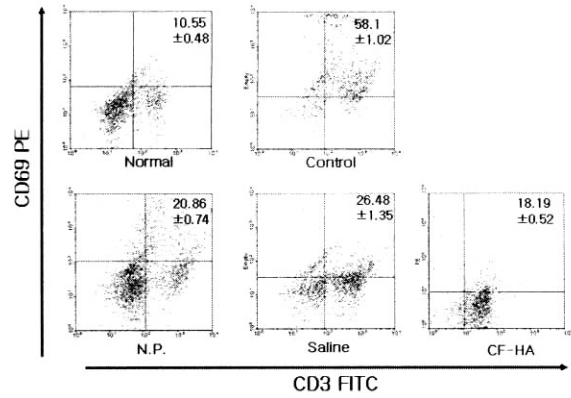


Fig. 15. The effect of CF-HA on CD3e⁺/CD69⁺ cell population in CIA mouse knee joint

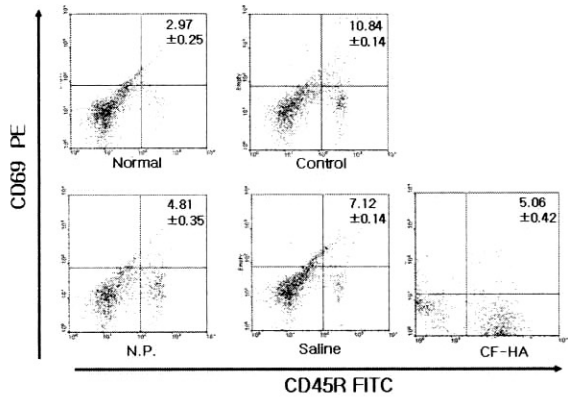


Fig. 14. The effect of CF-HA on CD45R⁺/CD69⁺ cell population in CIA mouse lymph node

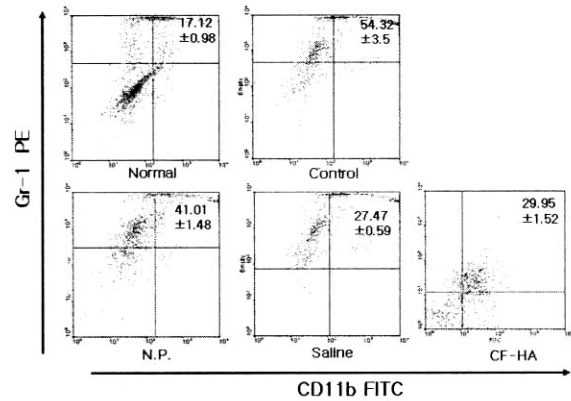


Fig. 16. The effect of CF-HA on CD11b⁺/Gr-1⁺ cell population in CIA mouse knee joint

화를 CD45R⁺와 CD69⁺의 표적 항체에 함께 반응하는 세포의 비율로 측정하였다. 모든 實驗群은 normal群에 비하여 CD45R⁺/CD69⁺세포의 비율이 증가하였으나 紅花藥鍼群은 control群, saline群에 비하여 CD45R⁺/CD69⁺세포의 비율이 현저히 감소하였다(Fig. 14).

10. 關節 내 면역세포에 미치는 영향

1) CD3e⁺/CD69⁺ cell population

關節 내 활성화된 T세포의 변화를 관찰하기 위하여 CD3e⁺와 CD69⁺의 표적 항체에 대한 반응이 함께 일어난 細胞의 비율을 측정하였다. 모든 實驗群은 normal群에 비하여 CD3e⁺/CD69⁺세포의 비율이 급격하게 증가하였으나 紅花藥鍼群에서 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 CD3e⁺/CD69⁺세포의 비율이 감소하였다(Fig. 15).

2) CD11b⁺/Gr-1⁺ cell population

關節 내 염증성 과립구의 변화를 관찰하기 위하여 FACS분석을 통하여 關節 내에서 CD11b⁺와 Gr-1⁺에 동시에 반응하는 세포를 측정하였다. 모든 實驗群의 CD11b⁺/Gr-1⁺세포의 비율은 normal群에 비하여 현저히 증가하였으나 紅花藥鍼群에서는 control群 및 N.P.群에 비하여 감소하였다(Fig. 16).

11. 關節의 조직학적 변화에 미치는 영향

1) Hematoxylin and eosin stain

關節 내 연골의 파괴 정도와 활막의 조직학적인 변화를 확인하기 위해서, 각 實驗群에서 얻은 관절조직을 절편하여 H&E stain을 실시하였다. Normal群에 비하여 control群에서 關節炎에 의한 연골의 파괴가 심

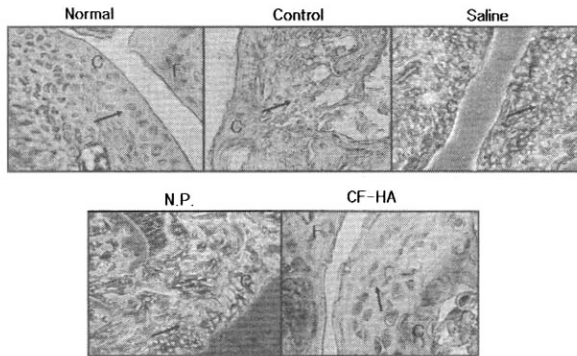


Fig. 17. Histological analysis of CIA mouse knee joint (H&E stain)

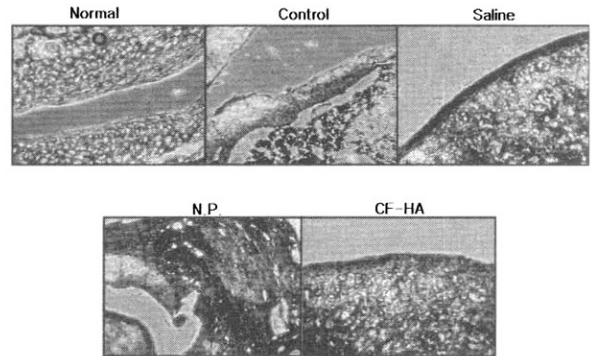


Fig. 18. Histological analysis of CIA mouse knee joint (M&T stain)

하게 일어났으며, control群에 비해서 saline群과 N.P.群 그리고 紅花藥鍼群에서는 연골의 파괴가 적게 일어났다. 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 연골의 파괴와 활막의 증식이 감소되어 normal群과 거의 유사한 組織 상태를 유지하였다 (Fig. 17).

2) Masson's Trichrome stain

關節 조직을 Masson's trichrome(M&T) stain하여 관찰한 결과, normal群에 비하여 control群에서 collagen fiber의 구성이 조밀하지 못하고 연골표면이 매끄럽지 않으며, collagen 섬유 조직이 파괴되어 있었다. 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비하여 collagen fiber가 정상에 가깝게 유지되었다(Fig. 18).

IV. 고 찰

류마티오이드 關節炎은 慢性 關節炎 가운데 退行性 關節炎 다음으로 흔한 交원성 질환(connective tissue disease)의 일종으로 주로 다발성으로 발생하며, 활액막의 만성 비대(hypertrophy) 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직을 파괴하여 초기에는 關節의 浮腫과 疼痛을 초래하나, 진행됨에 따라 특징적인 관절 변형 및 강직이 유발되고 전신적으로 쇠약해지며, 상당수에서 關節外 症狀, 즉 循環器系, 胃腸管系, 神經系 혹은 眼耳鼻咽喉科 영역에 關節症狀가 나타날 수도 있다¹⁸⁾.

류마티오이드 關節炎의 症狀는 關節內 症狀과 關節外 症狀로 구분되는데 關節內 症狀 중 關節痛과 관

절강직은 활액막염의 결과로 나타나고, 주로 손목, 손가락, 팔꿈치, 어깨, 무릎, 발목, 발가락 등의 활액막 關節에 주로 침범되나, 頸椎의 발병은 제한되며, 腰椎나 胸椎에서는 더욱 드물다. 關節의 발병양식은 전형적으로 다관절이며 대칭적으로 發生되며, 특히 아침과 수면 후 1시간 이상 계속되는 關節强直이 主訴症이다. 질환이 진행됨에 따라서는 關節의 浮腫과 압통, 피부의 자홍색 탈색이 나타나게 된다.

關節外 症狀는 주로 혈청이 양성인 환자에게서 나타난다. 神經系 病變으로는 완관절터널증후군, 말초신경증, 頸髓脊髓病, 족관절터널증후군 등이 있고, 筋骨格系 합병증으로는 筋의 衰弱, 骨多孔症 등이 나타난다. 血液系 합병증으로는 빈혈과 Felty씨 증후군, 혈관염 등이 나타나며, 心血關係는 백혈구과과성 혈관염이나 괴사성 혈관염, 협착성 심막염 등이 나타난다. 呼吸器系 합병증으로는 흉막염, 폐의 간질성 섬유화, 폐결절, 간질성 폐렴 등이 나타날 수 있고, 皮膚에서는 20-25%에서 피부결절이 나타난다¹⁸⁾.

류마티오이드 關節炎 治療의 첫 번째 목표는 疼痛의 減少와 염증의 억제 및 부작용의 감소에, 두 번째는 筋肉과 關節機能의 보존과 일상생활로 빠른 복귀에 있다^{18,19)}. 치료로는 보존적치료, 약물치료, 수술 등의 방법이 쓰이고 있고, 최근 활발히 연구가 進行되고 있는 藥物治療는 炎症誘發 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 拮抗物質을 이용하는 방법이다⁷⁾.

류마티오이드 關節炎은 韓醫學에서 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛風, 痺症, 等の 範疇에 屬한다고 볼 수 있고^{1,2,20)}, 이 중에서 痺症은 가장 포괄적인 의미로 제반 감각운동장애를 총칭한다.

紅花(*Carthami Flos*)는 菊花科 잇꽃(*Carthamus tinctorius* L)의 花를 건조한 것으로 性味는 辛溫無毒

하고, 心肝經에 歸經하여 活血通經, 散瘀止痛의 效能으로 瘀血에 의한 疼痛, 跌撲損傷, 急慢性 筋肉勞傷 등의 痺症 관련 증상과 經閉, 痛經, 惡露不行, 癥瘕痞塊, 瘡瘍腫毒에 應用되어 왔다. 또한 紅花에는 safflor yellow와 카르타민이 함유되어 있으며, 子宮痙에 대하여 흥분작용, 미약하지만 강압, 심장 억제的作用, 콜레스테롤, 총 지방, 니트로글리세린, 非에스테르형 지방산의 수치를 낮출 수 있다고 보고되고 있다^{21,22)}.

足三里(ST₃₆)는 足陽明胃經의 36번째 經穴로 膝下三寸 脛骨外廉 兩筋間에 위치하고, 胃經의 合穴이며 六腑下合穴, 回陽九鍼穴, 四總穴, 中風七處穴 중의 하나로, 理脾胃, 調中氣, 和腸消滯, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 去邪防病, 強健脾胃 등의 效能이 있어 많은 질환에 應用한다^{23,24)}.

藥鍼療法은 穴位注射療法, 水鍼療法이라고도 하는데, 經絡學說에 의하여 穴位 혹은 壓痛點에 藥物을 注入하는 新鍼法으로, 穴位의 經絡作用과 藥物의 藥理作用이 綜合的으로 충분히 發揮하게 하여 疾病을 治療하는 方法이다²³⁾.

病因病機상 류마티드 關節炎의 본질은 正虛感受 風寒濕 三邪이며 그 病理에 있어 瘀血과 관련성이 있다고 생각되어지며, 歷節風의 치료는 肝腎을 補하고 風寒濕의 原因을 除去하고 清熱시키고 鬱滯된 氣血을 疏通시키는 것이 중요하게 여겨져 왔다²⁵⁾. 따라서 活血通經, 散瘀止痛의 效能을 가진 紅花가 류마티드 關節炎에 유효하리라 생각되어 紅花藥鍼液을 實驗에 사용하게 되었다.

이에 著者는 collagen II 注入에 의하여 關節炎이 誘發된 생쥐의 足三里(ST₃₆)에 紅花藥鍼을 시술한 후, 關節炎 指數 및 발병률, 關節 및 비장의 외형변화, 몸무게의 변화, 혈청 및 비장세포배양액에서의 염증관련 cytokine, 면역글로불린 및 anti-collagen II의 수치, 비장과 림프절 및 關節 내의 면역세포 분석, 관절을 조직학적 분석, 관찰을 하여 류마티드 關節炎에 대한 紅花藥鍼의 效果를 實驗적으로 觀察하였다.

關節炎 指數(AI)는 1차 접종을 시점으로 평가하였는데, control群에서는 2차 접종 후 關節炎 指數가 급격하게 증가하였지만, 紅花藥鍼群에서는 2차 접종 실시 후 초기에는 control群보다 빠르게 증가하였으나 시간이 지나면서 점차적으로 지연되는 경향을 나타내면서 control群과 점진적인 차이를 나타내었다(Fig. 1). 關節炎을 유도한 實驗動物의 네 다리 關節을 관찰하여, 關節炎 점수가 한 다리 이상에서 degree 3 이상이거나, 두 다리 이상에서 degree 2 이상인 실험동물의

개체 수를 대표화하여 關節炎 발병률을 관찰한 結果, control群은 시간이 지나면서 關節炎 발병률이 점차 증가하였지만, 紅花藥鍼群은 30일을 전후로 급진적으로 關節炎의 반응이 심화되었으나, 실험 종료시에는 control群에 비해 감소되는 것으로 확인되었다. 또한 藥鍼을 처치한 우측 다리에서 좌측 다리에 비해 關節炎의 발병률이 낮게 유지되었다(Table 1). 紅花藥鍼군에서 실험 초기에는 關節炎 指數와 발병률 모두 일시적인 증가를 보였으나 시간이 지나면서 감소된 것으로 보아 임상에서도 초기에는 오히려 염증반응이 더 나타날 수도 있지만 지속적인 치료로 점차 효과가 나타날 수 있을 것으로 보이며 紅花藥鍼은 국소부위에 더 집중적인 효과를 보임을 알 수 있었다.

關節炎의 심화도를 객관적으로 평가하기 위하여 다리 關節의 부종 정도를 측정된 결과, normal群을 제외한 모든 群에서 關節의 붓기가 일어났다. 그러나 紅花藥鍼군에서는 실험 초기에는 control群과 유사하게 나타났으나 실험 중반에는 점차적으로 浮腫이 감소하는 경향을 보이기도 했다(Fig. 2).

關節炎 진행에 따른 實驗動物의 몸무게 변화를 측정한 결과, 2차 접종 후 control群의 몸무게는 점차 감소하였지만, 紅花藥鍼群은 지속적으로 증가하였다(Fig. 3). 이는 關節炎에 의해 發病된 關節의 변형, 浮腫, 痛症 등으로 말미암아 control群에서는 영양상태의 불량으로 체중감소가 유발되는 것을 알 수 있었다.

關節炎 발병에 따른 비장조직의 외형적 변화를 관찰한 결과, normal群에 비해 control群에서는 약간 증대되어 있었고, 비장 주위의 기관들과 협착 되어 있었다. 紅花藥鍼群에서도 이러한 경향은 있었으나 유착의 발생빈도는 control群에 비해 감소하였다(Table 2). 關節炎 유도에 따라 關節의 외형을 관찰한 결과, control群에서 normal군에 비해 關節 부위의 浮腫이 심해져 있었으며, 더불어 발가락 關節이 휘어지는 경우도 있었다. 紅花藥鍼群에서는 다른 實驗群에 비해 완화되어 나타났다(Fig. 4). 이 실험에서 control群은 關節炎의 증가에 따라 면역세포의 증식 및 저장의 역할을 하는 비장의 증대 및 주변 기관들의 협착이 나타나고, 關節에서도 浮腫 및 변형이 나타나지만, 紅花藥鍼群에서는 면역억제 작용으로 이러한 비장과 關節의 변화정도가 낮아진 것으로 생각된다.

實驗動物의 혈청에서 關節炎에 관여하여 나타나는 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ 의 생성 정도를 ELISA를 통하여 측정한 결과, IL-1 β 는 control群에서 normal群에 비해 증가하였으며, 紅花藥鍼群에서

는 control群에 비해 유의성 있게 감소하였고, IL-6는 normal群에 비해 모든 群에서 증가하였으나, 紅花藥鍼群은 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 유의성 있게 감소하였다. TNF- α 는 normal群에 비해 모든 群에서 증가하였지만, 紅花藥鍼群은 control群에 비해 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 는 normal群에 비해 control群은 증가하였고, 紅花藥鍼群은 control群에 비해 유의성있게 감소하였다(Table 3).

IL-1 β 는 류마티드 關節炎에서 T細胞와 B細胞의 기능을 증진시키고 호중구, 림프구, 단핵細胞의 침윤을 유발하며, 내피세포에 대한 백혈구의 유착성을 증가시키고, 섬유모세포, 활액막 세포 및 연골 세포에서 관절 연골의 파괴와 뼈의 재흡수를 초래하고^(26,27), IL-6는 류마티드 關節炎의 염증반응에 주된 매개 작용으로 혈청 및 關節炎의 손상된 關節의 關節液에서 활성도가 증가하며, 骨關節炎보다 높은 활성도를 보여 류마티드 관절염의 활성도와 연관성이 있다⁽²⁸⁾. IFN- γ 는 대식세포를 활성화시켜 탐식세포를 파괴하는 효소합성을 항진시킬 뿐 아니라 대식세포가 암세포를 죽이는 기능을 항진시킨다⁽²⁹⁾. 이러한 IL-1 β , IL-6, IFN- γ 의 감소는 紅花藥鍼이 염증 억제에 효과가 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

實驗動物의 血清에서 IgG, IgM, anti-collagen II의 항체 농도를 ELISA를 통하여 측정한 결과, 혈청 IgG는 normal群에 비해 모든 群에서 생성이 증가되었으며, N.P.群은 control群에 비해 실험 시작 4주째에 가장 높았으나, 이후 지속적인 감소가 나타났고(Fig. 5), 혈청 IgM은 normal群에 비해 모든 群에서 생성이 점진적으로 증가되었으나, 紅花藥鍼群에서는 실험 후 반부에 control群에 비해 약간 감소하였고(Fig. 6), 혈청 Anti-collagen II는 normal群에 비해 모든 實驗群에서 농도가 증가되었으나, 紅花藥鍼群은 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 농도가 감소하였다(Fig. 7).

전형적인 류마티드 關節炎 환자의 B 임파구는 혈청이나 關節 내에서 자가 항체인 IgG, IgM 등과 항원에 따른 항체를 분비하며⁽³⁰⁾, 關節炎 발생초기에는 B 림프구의 표면에서 방출되는 IgG, anti-collagen 항체는 제II형 collagen에 대한 특이반응을 보여 이 항체가 증가하는 경우 關節炎이 발생하게 되는데⁽³¹⁾, 이러한 IgG, IgM, anti-collagen 항체의 감소는 紅花藥鍼이 關節炎 억제 효과가 있음을 알 수 있다. 紅花藥鍼群에서 IgG, IgM이 초기에 증가하지만 시간이 지날수록 감소하는 것으로 보아, 關節炎 지수와 關節炎 발병률에서와 마찬가지로 초기에는 약간의 증상의 심화

가 있었으나 이후 지속적인 紅花藥鍼 시술로 염증억제 효과가 있음을 알 수 있다.

實驗動物의 비장조직에서 細胞를 분리하여 關節炎 발병에 의한 면역작용을 일으키는 cytokine인 IFN- γ , IL-4, IL-10을 측정된 결과, 비장세포의 IFN- γ 는 normal群에 비해 모든 實驗群에서 증가하였으나, 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 유의성 있게 감소하였고, 비장세포의 IL-4는 紅花藥鍼群에서 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 증가하였다. IFN- γ /IL-4의 비율은 normal群에 비해 control群에서는 증가하였고, 紅花藥鍼群은 control群에 비해 감소하였다. IL-10은 normal群에 비해 모든 實驗群에서 증가를 보였으며, N.P.群, saline群, 紅花藥鍼群에서는 control群에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

IL-4, IL-10은 IL-1 β 와 TNF- α , IL-6, IL-8의 전사를 억제하여 과잉 생산을 차단하는데⁽³²⁾, IL-4는 IFN- γ 의 활성화효과를 길항해서 세포매개 면역반응을 저해하고⁽³³⁾, IL-10은 활성화된 대식세포와 수지상세포가 IL-12와 TNF를 생성하는 것을 방해하는데 IL-12는 IFN- γ 분비의 결정적인 자극제이다^(36,38). 이러한 IFN- γ , IL-4, IL-10이 紅花藥鍼群에서 감소한 것은 紅花藥鍼이 關節炎에서 면역억제 및 조절작용이 있는 것으로 생각된다.

비장 내 면역세포를 分析하기 위해 비장 내 총세포수, CD3e⁺/CD45R⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺를 측정한 결과, 비장 내 총세포수는 CF-HA群에서 control群에 비해 유의적으로 감소하였고(Fig. 8), CD3e⁺/CD45R⁺는 control群에서는 normal群에 비해 CD45R⁺의 비율이 증가하였지만, 紅花藥鍼群에서는 CD45R⁺의 비율이 줄어 CD3e⁺/CD45R⁺가 정상에 가깝게 감소하였다(Fig. 9). CD4⁺/CD8⁺는 control群에서는 CD8⁺의 비율이 증가하였지만, 紅花藥鍼群에서는 CD4⁺/CD8⁺가 정상에 가깝게 나타났고(Fig. 10), CD4⁺/CD25⁺는 normal群에 비해 saline群 및 control群에서는 증가하였지만, N.P.群 및 紅花藥鍼群에서는 현저하게 감소하였다(Fig. 11).

면역세포는 세포의 종류나 분화 단계에 따라서 특징적인 표면분자(cluster of differentiation, CD)를 표현한다. 實驗에서 측정된 CD의 감소는 면역반응에 관여하는 면역세포의 감소를 의미한다. CD3e는 T 세포 항원 수용체와 밀접하게 연관된 것으로 항원 결합의 신호를 세포안으로 전달하고, 성숙 T 세포를 인지는 기능을 하고, CD45는 B220이라고도 불리며 T 세포

및 B 세포의 항원 수용체에 매개적 신호 전달에 중요한 역할을 하고, pro B세포부터 성숙 B세포까지를 인지한다³²⁾. CD4는 MHC 제이항원과 결합하여 보조 T 세포를 활성화하고, B세포에 항원을 전달하여 항체 생성을 誘發하는 보조 T세포이고, CD8은 MHC 제이항원과 결합하여 세포독성 T세포와 억제 T세포에 항원을 전달하는 세포독성 T세포로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있고^{23,33)}, CD4⁺/CD25⁻는 특정 T세포가 자가 특이 T세포의 활성을 능동적으로 억제하여 자가면역반응이 정상적인 면역반응을 유지하는데 중요한 역할을 하여 면역조절 T세포(regulatory T)라 하며, 면역 반응이 정상적인 면역 반응을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³⁴⁾. 이러한 비장 내 총 세포수의 감소와 비장 내 CD3e⁺/CD45R⁺, CD4⁺/CD8⁺가 紅花藥鍼群에서 정상에 가깝고 CD4⁺, CD25⁺가 감소한 것은 紅花藥鍼이 關節炎의 유발을 억제하여 나타난 결과로 생각된다.

림프절 내 면역세포를 분석하기 위해 림프절 내 총 세포수와 FACS 분석을 통해 CD4⁺/CD25⁻, CD45R⁺/CD69⁺를 측정된 결과, 림프절 내 총세포수는 normal群에 비해 control群에서 증가하였으나 紅花藥鍼群에서는 control群에 비해 증가하였고(Fig. 12), CD4⁺/CD25⁻는 normal群에 비해 모든 實驗群에서 증가하였으나 紅花藥鍼群에서는 control群에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 13). CD45R⁺/CD69⁺는 control群에서 normal群에 비해 크게 증가하였으나 紅花藥鍼群에서는 control群이나 saline群에 비해 감소하였다(Fig. 14).

CD69는 휴지기 임파구에서는 발현되지 않으나, T 임파구가 활성화 되면 2시간 이내에 발현이 되는 초기 활성화인자로 불리기도 하는 세포표면 단백질이다³⁵⁾. 이러한 림프절 내 총세포수와 림프절 내 CD4⁺/CD25⁻, CD45R⁺/CD69⁺가 紅花藥鍼群에서 감소한 것은 紅花藥鍼이 關節炎의 유발을 억제시키는 것으로 사료된다.

關節 내 면역세포를 분석하기 위해 FACS 분석을 통해 무릎관절의 CD3e⁺/CD69⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺를 측정된 결과, CD3e⁺/CD69⁺는 control群에서 normal群에 비해 급격히 증가하였으나, 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 감소하였다(Fig. 15). CD11b⁺/Gr-1⁺는 control群에서 normal群에 비해 현저하게 증가하였으나 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 16).

CD11b⁺는 단핵세포, 과립구, NK 세포에서 발현되는 세포표면분자로서, 이 세포들은 염증 시에 제일 먼저 도착하는 혈구들로 신체에 침투한 항원에 대한 탐

식작용을 하고³⁶⁾, Gr-1은 골조직 내에서 과립백혈구에 양성 반응을 보였다³²⁾. 이러한 관절 내 CD3e⁺/CD69⁺와 CD11b⁺/Gr-1⁺가 紅花藥鍼群에서 감소한 것은 紅花藥鍼이 關節炎의 유발을 억제하여 나타난 것으로 생각된다.

關節 내 연골의 파괴정도와 활막의 조직학적인 변화와 collagen 섬유조직의 파괴정도를 확인하기 위해 각 實驗群에서 얻은 관절조직을 절편하여 염색하여 관찰한 결과, H&E stain에서는 normal群에 비해 control群에서 關節炎에 의한 연골의 파괴가 심하게 일어났으나 control群에 비해 saline群, N.P.群 및 紅花藥鍼群에서는 연골의 파괴가 적게 일어났고, 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 연골의 파괴와 활막의 증식이 감소되어 normal群과 거의 유사한 조직 상태를 유지하였다(Fig. 17). M&T stain에서는 normal群에 비해 control群에서 collagen fiber의 구성이 조밀하지 못하고, 연골 표면이 매끄럽지 않으며, collagen 섬유 조직이 파괴되어 있었으나 紅花藥鍼群에서는 control群, saline群 및 N.P.群에 비해 collagen fiber가 정상에 가깝게 유지되고 있었다(Fig. 18).

H&E stain은 조직의 구조를 관찰하기 위한 염색법이고, M&T stain은 collagen fiber를 관찰하기 위한 염색법으로 이를 이용한 關節조직의 관찰에서 紅花藥鍼群이 정상과 유사한 상태가 나타난 것은 紅花藥鍼이 연골파괴, 염증세포의 증식, collagen fiber의 파괴를 감소시키는 것으로 추측된다.

이상의 결과에서 紅花藥鍼이 류마티스 關節炎에 대한 영향을 關節炎 지수 및 발병률, 關節의 浮腫 및 외형변화, 비장의 크기 및 외형변화, 체중의 변화, 혈청 및 비장세포에서의 염증 관련 cytokine, 면역글로불린 및 anti-collagen II의 수치, 비장과 림프절 및 關節 내의 면역세포, 關節의 조직학적 분석 등을 통해 살펴본 결과, 면역세포조절과 염증 억제에 대한 유효성을 확인할 수 있었으며 향후 임상적 활용을 위해서는 보다 많은 研究가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Collagen type II로 關節炎을 유발시킨 DBA/1J 생쥐를 대상으로 紅花藥鍼이 CIA 생쥐에 미치는 영향을 알아보기 위한 關節炎 지수 및 발병률, 關節의 浮腫 및 외형 변화, 비장의 크기 및 외형 변화, 체중의

변화, 혈청 및 비장세포에서의 염증 관련 cytokine, 면역글로블린 및 anti-collagen II의 수치, 비장과 림프절 및 關節 내의 면역세포, 關節의 조직학적 분석을 하여 紅花藥鍼群과 control群을 비교 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 關節炎 지수, 발병률이 감소하였다
2. 비장의 증대와 협착, 關節의 浮腫과 변형이 감소하였다.
3. 혈청 내 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ 가 control群에 비해 유의성 있게 감소하였다.
4. 紅花藥鍼群은 control群에 비하여 IgG, IgM, anti-collagen II가 control群에 비해 감소하였다.
5. 비장세포 배양액에서 IFN- γ , IFN- γ /IL-4, IL-10이 유의성 있게 감소하였다.
6. 비장 내의 CD3e⁺와 CD45R⁺, CD4⁺와 CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺ 세포 비율이 normal群과 유사한 비율을 유지하였다.
7. 임파절 내의 CD4⁺/CD25⁺, CD45R⁺/CD69⁺ 세포 비율이 normal群과 유사하게 감소하였다.
8. 關節 내의 CD3⁺/CD69⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포 비율이 normal群과 유사하게 감소하였다.
9. H&E stain에서는 연골의 파괴 및 염증세포의 증식이 감소되었고, M&T stain에서는 collagen fiber가 덜 파괴되어 normal群에 가깝게 유지하였다.

VI. 참고문헌

1. 권재상. 비증. 서울 : 정담. 1993 : 207-70.
2. 裴元植. 最新韓方臨床學. 서울 : 南山堂. 1989 : 446.
3. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 2000 : 175-89.
4. 장중호. 류마티스성 관절염. 서울 : 화산문화. 1997 : 25.
5. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학. 서울 : 군자출판사. 1996 : 1262-64.
6. 오영선, 오민석, 송태원. 류마티스 관절염의 한, 양방적 약물치료의 최신경향 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2002 ; 11(1) : 217-35.
7. Marc Feldmann. Role of cytokines in Rheumatoid Arthritis. London : Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 398-9.
8. 이윤호, 박동석, 김정근. 침·구 및 진교수침이 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1989 ; 10(1) : 125-31.
9. 김낙현. 梔子藥針이 白鼠의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 대전 : 大田大學校 碩士學位論文. 1996.
10. 안규석 외 2명. 血栓症과 高粘度血症에 미치는 黃芪, 桂枝 및 紅花 효능에 관한 실험적 연구. 대한동의병리학회지. 1989 ; 4(1) : 74.
11. 김영태. 水蛭 및 紅花藥鍼이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향. 경산대학교 제한동의학술원논문집. 1997 ; 2(1) : 116.
12. 안창범, 송춘호, 장경진, 윤현민, 서정철, 김철웅. 紅花藥鍼液이 t-Butylhydroperoxide에 의한 가토의 뇌조직 Na⁺-K⁺-ATPase 활성장애에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(2) : 150.
13. 윤민영, 조남근, 허태영, 조은희, 이옥자, 김경식, 문성재. 요통환자의 홍화약침치료에 대한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 216.
14. 기성식, 길기정, 이영중. 홍화와 익모초가 CCl4로 손상된 흰쥐의 간에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001 ; 16(2) : 79.
15. 徐榮培, 李龍求, 李永喆, 閔平基. 홍화의 조혈작용에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지. 2002 ; 17(1) : 13.
16. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med. 1997 ; 146 : 857-68.
17. Saijo S, Asano M, Horai R, Yamamoto H, Iwakura Y. Suppression of autoimmune arthritis in interleukin-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40 ligand and OX40 expression on T cells. Arthritis Rheum. 2002 ; 46(2) : 533-44.
18. James B Wyngaeden. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia. WA Sauders company. 1992 : 1508-15.
19. 김성운. 류머티스 관절염의 진단과 치료. 서울 : 가정의학회지. 1993 ; 15(1) : 51-7.
20. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1985 : 385-9.
21. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울 : 永林社. 1998 : 424-5.

22. 김창민 등 역. 중약대사전. 서울 : 도서출판 정담. 2004 : 4931-35.
23. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上, 下). 서울 : 集文堂. 1991 : 382-4, 1457-67.
24. 安營基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 196-7.
25. 권영달, 송용선. 류머티스성 관절염(Rheumatoid arthritis)에 대한 東西醫學的 考察. 대한한의학회지. 1994 ; 15(2) : 373-96.
26. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32, 134, 148-50.
27. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 1997 ; 63, 118, 120-8, 175-87.
28. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울 : 서울대학교 출판부. 1997 : 100, 114, 117, 122-31, 179, 180, 253, 255, 262, 266-9.
29. 강제성. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2004 : 243-53, 261-9, 423.
30. 김세윤. 류마티스 진료. 서울 : 군자출판사. 2001 : 219.
31. Cremre MA et al. An experimental model of relapsing polychon ddritis induced with arthritis type II collagen. J Exp Med. 1981 ; 154 : 535-40.
32. Abul K Abbas, Andrew H Lichtman. 細胞分子免疫學 5판. 서울 : 범문사. 2004 : 243-53, 261-9, 423- 4, 506-12.
33. 하대유. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 242, 404, 408-9.
34. Alexander Scheffold, Jochen Huhn, Thomas Hofer. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity. Eur J Immunol. 2005 ; 35 : 1336-41.
35. Robert R Rich et al. Clinical Immunology. New York : Mosby. 2001 ; chap 4 : 13, chap 6 : 18.
36. 전국외과대학교수 역. Mosby's crash course. Immune Blood & Lymphatic System. 서울 : 한우리. 2000 : 17-21.