

원저

紫河車약침이 제2형 콜라겐 유발 관절염에 미치는 영향

조영욱* · 이승우* · 강민주** · 김은정* · 이승덕* · 김갑성*

*동국대학교 한의과대학 침구학교실

**이성수한의원

Abstract

Effect of *Hominis placenta* Herbal Acupuncture on Type II Collagen-induced Arthritis in Mice

Jo Young-wook*, Lee Sung-woo*, Kang Min-joo**, Kim Eun-jung*, Lee Seung-deok* and Kim Kap-sung*

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

**Lee Sung Soo Oriental Medical Clinic

Objectives : We investigated the effects of *Hominis placenta* Herbal acupuncture on rheumatoid arthritis.

Methods : We investigated the Type II collagen-induced arthritis test, vascular permeability test, phenyl benzoquinone-induced writhing test, hot plate test, carbon clearance test, determination of prostaglandin E₂ content and cyclooxygenase-2 activity test.

Results : *Hominis placenta* Herbal acupuncture suppressed Type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice and vascular permeability with 10.2% inhibition in ICR mice. We see the phenyl benzoquinone-induced writhing test and the hot plate test in the analgesic activity test. In the phenyl benzoquinone-induced writhing test, *Hominis placenta* Herbal acupuncture showed that it increased its analgesic effect more than the control(test?) by 85.5%. In the hot plate test, it was also shown that the analgesic effect increased more than the control(test) by 32.1%. In the carbon clearance test, the immuno-stimulatory effect showed more than the control(test) by 8.0%. The formation of prostaglandin E₂ was also reduced more than the control(test) by 10.1%. Finally, cyclooxygenase-2 activity was inhibited with 36.3%.

Conclusions : *Hominis placenta* Herbal acupuncture may be useful for the treatment of rheumatoid arthritis after injection.

Key words : *Hominis placenta*, Herbal acupuncture, Rheumatoid arthritis, Type II collagen-induced arthritis

I. 緒 論

류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis, RA)은 점진적인 활막 증식과 관절 파괴를 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로, 한의학에서는 《金匱要略》에 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體尪羸, 脚腫如脫”이라고 기록된 이후 여러 문헌에서 언급하고 있으며, 風·寒·濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損을 발병원인으로 보고 있다¹⁾. 류마티스 관절염의 특징은 염증이 만성적으로 여러 관절에 영향을 미쳐 활액과형성(synovial hyperplasia)을 야기하며 마지막에는 관절과괴와 관절 변형을 일으킨다. 골재생과 골손실의 기전은 점차 밝혀지고 있으나 아직 류마티스 관절염의 발병원인에 대해서는 명확하지 않다. 다만 류마티스 관절염과 염증 동물모델에서 골침식 부위에 파골세포(osteoclast)들이 출현하는 것은 파골세포의 분화와 활성화를 유발하는 골영양인자들(osteotrophic factors)이 관절 침식의 원인에 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 추정하고 있다^{2,3)}. 파골세포의 분화와 활성화를 조절하는 인자로 cytokine 및 hormone, 예를 들면 macrophage colony stimulating factor(M-CSF), transforming growth factor(TGF)- β , tumor necrosis factor(TNF)- α , interferon(IFN)- γ , interleukin(IL)-1 α , IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-17, calcitonin, estrogen 등이 알려져 있으며 최근에는 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)가 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되었다^{4,5)}. 현재 류마티스 관절염의 약물 치료방법으로는 항류마티스 약물, 비스테로이드성 소염제(NSAIDs), 스테로이드성 약물 등이 있으며 최근에는 TNF- α -중화 요법을 methotrexate와 병용하면 임상적으로 유효한 것으로 보고되어 있다⁶⁾. 그러나 이들 약물을 장기간 사용했을 때의 효용성에 대해서는 아직 증명되지 않았으며 오히려 부작용이 다수 보고되었다. 따라서 관절염 초기와 달리 장기간 투여에는 많은 제약이 따른다.

紫河車(*Hominis placentae*)는 사람의 태반을 건조시킨 것으로, 性은 溫하며 味는 甘, 鹹, 無毒하다. 歸經은 肺, 肝, 腎 三經이다. 주로 補精益陽, 養血益氣하여 肺, 肝, 腎 계통의 허손질환을 치료하는 데에 활용한다고 기록되어 있다. 紫河車약침의 경우 임상에서 만성간염, 간경변, 기관지천식, 폐결핵, 남녀불임, 모유분비불량, 노화현상, 신경쇠약, 뇌졸중 등의 병증치료에 응용되고 있다⁷⁾.

紫河車약침의 효능에 대한 검증은 흰쥐의 adjuvant 유발 관절염에 대한 효과와 cytokines 억제효과 등⁸⁾이 보고되었으며 염증물질의 면역화학적 조사⁹⁾와 LPS 유발 관절염에서의 조직손상 완화, cytokines 억제 및 iNOS 효소활성 억제효과 등¹⁰⁾의 결과가 보고되어 있을 뿐 아직 류마티스 관절염에 대한 연구결과는 보고되지 않았다.

이에 저자는 肺, 肝, 腎의 허손을 보충하여 주며, 조직재생과 항염증작용 등이 있는 자하거가 허손병에 해당하는 류마티스 관절염의 치료에 효과가 있을 것으로 사료되어, 제2형 collagen 유발 관절염 모델의 인체 족삼리(ST₃₆)에 상응하는 부위에 자하거 약침을 주입하여 collagen 유발 관절염 억제효과, 모세혈관 투과성, 염증동통 억제효과, 면역력 강화효과, 염증유발물질 억제효과 및 염증유발물질 생성효소활성도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

류마티스성 관절염 모델 시험에서 사용한 실험동물은 5주령의 웅성 DBA/1J mouse(SLC Inc, Japan)를 수입하여 사용하였으며, 일반실험을 위한 동물은 8주령의 ICR계 체중 30 \pm 1g 웅성 mouse(한국실험동물개발, 대한민국)를 사용하였다. 미생물 monitoring에서 모두 음성을 나타낸 건강한 mouse를 동국대학교 동물사육사에서 일정한 조건(온도 : 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도 : 55 \pm 5% 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 사육하여 사용하였다. 실험동물은 1주일간 실험실 환경에서 적응시켰으며, 실험 개시 전 24시간 동안 물만 먹고 절식시켰다. 동물처치는 효소활성의 일중변동을 고려하여 오전 10-12시 사이에 실시하였다.

2) 시약

자하거 약침액은 자하거 2호(대한약침학회, 대한민국)를 사용하였으며, Evans blue, collagen(Bovine type II), Complete Freund's Adjuvant, phenyl benzoquinone, gelatin, phospahte-buffered saline(PBS), fetal bovine serum, lipopolysaccharides(LPS), RAW

264.7 cell, penicillin, streptomycin, Tween80, 양성대조약물(ibuprofen, cyclophosphamide, acetaminophen, zymosan, aspirin)은 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. YPEN-1 cell은 ATCC사(USA), Micro BCA assay kit는 Pierce사(Rockford, USA) 제품을, Prostaglandin E2 EIA kit는 Cayman사(Michigan, USA) 제품을 사용하였으며 각종 용매와 무기시약은 모두 국산 특급을 사용하였다.

3) 기기

원심분리기는 Beckman 제품(Beckman, USA)을, ultracentrifuge는 Kontron T-2080(Kontron, Switzerland)을 사용하였으며, 활성측정을 위한 흡광도는 UV-2001S spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 측정하였고 조직마쇄를 위한 homogenator는 Heidolph RZR 2021(Heidolph, Germany)을, Rotary vacuum evaporator는 Eyela NE(Eyela, Japan) 제품을, Vortex mixer는 G-50(Scientific Industries, USA)을, 항온수조는 MWB-20R(Mono Tech, Korea)을, 그리고 Hot plate는 SH 30D(Jeio Tech, Korea)를 각각 사용하였다. 체중계는 mouse 전용 체중계로서 Ohaus Navigator N02120(Ohaus, Switzerland)을 사용하였다.

2. 방법

1) 실험군 분류 및 처치

자하거 약침을 주사한 관절 경혈 부위는 인체에 상응하는 족삼리(ST₃₆)이며 슬개골 바깥쪽 무릎아래 약 1cm 부위이며, 한쪽만 주사하였다. 사용한 실험동물 수는 콜라겐 유발 관절염의 경우 DBA/1J mouse 4마리 사용했으며 나머지 군은 모두 ICR mouse 각 7마리를 사용하였다. 각 군은 정상군, 대조군, 실험군 및 양성대조군 등 4개 군으로 나누었으며 다음과 같이 정의된다.

- ① 정상군(normal group) : 약물 투여 없이 사육한 군
- ② 대조군(control group) : 약물을 투여하지 않고 각 실험별로 효과를 확인하고자 하는 증상을 유발시킨 군
- ③ 실험군(experimental group) : 증상유발 후, 자하거 약침을 투여한 군
- ④ 양성대조군(positive control group) : 증상유발 후, 항염증시험에서 대조 약물을 투여한 군

2) 체중변화 관찰

전 실험기간동안 mouse 전용 체중계로 정밀 측정하여 염증발현 및 치료기간 동안의 체중변화를 기록, 비교하였다.

3) Collagen 유발 관절염 억제효과

류마티스성 관절염 모델 시험에서 관절염 유발물질로 Bovine type II collagen을 사용하였다. Collagen 주사액은 collagen을 0.01M HOAc에 3mg/ml 농도로 희석한 다음, Complete Freund's Adjuvant를 동량 섞어 현탁화하여 제조하였다. Control group에는 현탁액 100 μ l를 꼬리기저부위에 주사하여 면역화시켰다. 첫날(day 0, 1st immunization)에는 위의 현탁액 0.1ml를 꼬리기저부위(tail base)에 주사하였으며, 21일째(day 21, 2nd immunization)에는 collagen 75 μ g을 0.01M HOAc에 용해한 다음, 0.1ml를 꼬리기저부위에 주사하여 관절염을 촉진시켰다(booster injection). 실험군에는 첫날부터 73일째까지 자하거 약침액 50 μ l를 주사하였으며 양성대조군에는 cyclophosphamide 5mg/kg을 0.5% CMC에 녹여 경구투여하였다. 각 군에 대하여 관절염의 clinical severity score는 15일째부터 1주일에 한 번씩 Williams 법¹¹⁾에 준하여 다음과 같은 기준으로 판정하였다.

grade(G) G0 : 정상군 수준(normal), G1 : 약간의 부종(swelling) 또는 홍반(erythema), G2 : 심각한 부종 또는 홍반, G3 : 관절변형(joint distortion and/or rigidity)

4) 모세혈관투과성 시험

염증 초기단계에서 모세혈관투과성이 증가되는 것을 억제하는 효과를 Whittle 등의 방법¹²⁾에 따라 측정하였다. 원리는 복강 내에 유출되는 Evans blue의 색소량을 정량하는 것이다. 대조군에는 1% Evans blue 0.3ml를 꼬리 정맥에 주사하였고, 실험군에는 자하거 약침액 50 μ l를 주사한 후, 30분에 Evans blue를 주사하였다. 양성대조군에는 ibuprofen 200mg/kg을 경구투여 한 다음 30분 후에 Evans blue를 주사하였다. 각 군에 대하여 20분 후, 염증유발 및 혈관투과성 증대를 위해 0.6% acetic acid의 saline 용액(0.1ml/10g)을 복강주사하였다. 20분 후에 복강내부를 10ml saline으로 세척 후, 채취하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 610nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Phenyl benzoquinone 유발

염증동통 시험(Writhing test)¹³⁻¹⁶⁾

진통효과의 측정은 동통유발물질인 phenyl benzoquinone 투여시 동통때문에 뒷다리를 쭉 뻗는 stretch (writhing syndrome) 횡수를 측정하여 대조군과 진통효과를 비교, 관찰하였다. 대조군에는 0.03% phenyl benzoquinone(4.5mg/kg) 0.1ml를 복강주사하였으며 실험군에는 자하거 약침액 50 μ l 주사 1시간 후, phenyl benzoquinone을 주사하였고 양성대조군에는 acetaminophen 80mg/kg의 용량을 0.1ml 주사한 다음, phenyl benzoquinone을 주사하였다. 각 group에 대하여 phenyl benzoquinone 주사 후, 20분간 writhing 시작시간 (writhing latency time) 및 횡수(frequency)를 측정하여 진통효과를 관찰하였다. 이 때, 용매(vehicle)는 EtOH : Tween80 : saline = 10 : 10 : 80(v/v%)를 사용하였으며 phenyl benzoquinone 용액은 하루 지나면 노란색이 변하여 옅은 갈색으로 변하므로 사용시 제조하였다. Writhing 저해율은 아래 식으로 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{대조군의 writhing 횡수} - \text{실험군의 writhing 횡수}}{\text{대조군의 writhing 횡수}} \times 100$$

6) Hot plate test

Hot plate test는 Suh 등의 방법¹⁷⁾에 따라 실시하였다. 50-55 $^{\circ}$ C의 뜨거운 hot plate에 실험동물을 올려 놓고 jump하는 시간을 측정하여 진통효과를 조사하였다. 측정시간은 실험동물의 화상을 방지하기 위하여 40초를 cut-off time으로 하였다. 실험군에는 자하거 약침액 50 μ l 주사 1시간 후, hot plate test를 실시하였으며 대조군에는 acetaminophen 80mg/kg의 용량을 0.1ml 주사한 다음 test를 실시하였다. 저해율(inhibition rate)은 아래 식으로 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{실험군의 jump 시간} - \text{대조군의 jump 시간}}{40\text{초(cut-off value)} - \text{대조군의 jump 시간}} \times 100$$

7) Carbon clearance test

Wagner 등의 방법¹⁸⁾을 변형하여 다음과 같은 방법으로 면역력 강화여부를 확인하였다. 대조군에는 1% gelatin을 포함한 phosphate-buffered saline에 rotring ink를 8배 희석한 carbon suspension 10ml/kg을 꼬리 정맥에 주사하였다. 실험군에는 자하거 약침액 50 μ l를

3일간, 하루 1회 주사하였으며 양성대조군으로는 zymosan 50mg/kg을 경구투여하였다. 각 군에 대하여 투여 후 3, 6, 9, 12분에 안와정맥으로부터 채혈하여 혈액 20 μ l를 0.1% sodium carbonate 1.5ml에 희석하고 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 -log E 값을 구하여 검체투여군(Rexp)의 대조군(Rcon)에 대한 regression coefficient ratio(회귀계수를 RCR = Rexp/Rcon)를 계산하였다.

8) Prostaglandin E₂ 정량

염증유발물질로 알려진 Prostaglandin E₂(PGE₂)의 함량을 다음과 같은 방법으로 정량하여 염증유발물질의 억제여부를 관찰하였다. PGE₂ 유발물질로는 LPS를 사용하였다. RAW 264.7 cell을 중탄산나트륨 2.0g, 항생제인 penicillin 100U/ml 및 streptomycin 100U/ml, 그리고 열처리한 10% fetal bovine serum을 혼합한 RPMI-1640 배지에서 배양하였으며 이때 5% CO₂를 함유한 incubator에서 37 $^{\circ}$ C로 계속 유지시켰다. 이 cell을 six-well plate에 배양한 다음, 자하거 약침액과 함께 24시간 incubation하였다. PGE₂의 함량을 정량하기 위하여 배양액의 상정액 100 μ l를 취하여 Cayman Enzyme Immunoassay kit를 사용하여 ELISA로 측정하였다.

9) Cyclooxygenase-2 억제 활성

염증유발물질을 생성하는 Cyclooxygenase-2(COX-2)의 효소활성은 YPEN-1 cell(혈관내피세포)을 이용하여 COX-2를 유도하는 약물인 t-BHP(tert-butyl hydroperoxide)를 처리한 후, COX-2 inducer에 의해 유도된 COX-2를 자하거 약침액이 저해하는 정도를 측정하여 염증억제의 원인을 분석하였다. 세포배양은 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였으며 단백질 함량은 Micro BCA assay kit를 이용하여 측정하였다. 양성대조약물로는 aspirin을 사용하였으며 시료의 final concentration은 20mg/ml로 하였다.

10) 통계처리

모든 실험결과는 통계프로그램인 Origin(Microcal Software Inc, MA, USA, Version 3.78)으로 처리하였으며 data는 mean \pm S.E로 표시하였고 통계적 유의성은 SPSS 10.0(SPSS Inc, USA) program을 이용하여 Student's t-test 또는 ANOVA로 검정하였으며 유의수준은 P value (* p<0.05)로 나타내었다.

III. 結 果

1. Collagen 유발 관절염 억제 효과

1) 체중변화

대조군은 실험착수일(0일)로부터 실험 제73일까지 체중 19.4±0.6g에서 22.6±0.4g으로 16.6% 증가하였으며, 자하거 약침군과 양성대조군 모두에서 각각 28.0% 및 24.3%로 나타나 체중증가가 인정되었으나, 대조군에 비하여 유의성은 없었다(Table 1, Fig. 1).

2) 관절염 억제 효과

대조군은 4주부터 관절염 증상이 나타나기 시작하여 8주에 가장 심한 증상을 보였으며 그 이후에는 증상이 비슷하게 지속되었다. 자하거 약침군은 5주부터 약간의 증상을 보이기 시작하였으나 그 증상은 대조군보다 훨씬 약하였으며 7주부터는 더 이상 악화되지 않았으며, 10주 경과시에도 1.00±0.25로 대조군 2.25±0.48에 비하여 유의성은 없었다. 모든 기간의 효과에서 유의성은 없었으나 대조군과는 많은 차이를 보여주었다. 한편, 양성대조군은 10주 경과시에도 0.25±0.25로 감소하였으나 대조군 2.25±0.48에 비하여 유의

Table 1. Body weight change of type II collagen induced arthritis in mice(unit : g)

Group	Day	0	18	21	25	28
	Control		19.4±0.6	17.5±0.6	18.4±0.7	20.3±0.7
<i>Hominis placenta</i>		17.5±0.4	17.7±0.7	18.0±0.6	20.5±0.5	20.7±0.4
Cyclophosphamide		18.1±0.4	18.4±0.6	18.7±0.4	20.7±0.3	20.4±0.4
		32	35	38	42	45
Control		21.3±0.5	21.4±0.5	20.1±0.4	19.4±0.5	22.8±0.5
<i>Hominis placenta</i>		21.4±0.2	21.3±0.3	20.7±0.2	21.0±0.3	22.3±0.3
Cyclophosphamide		21.6±0.9	21.4±0.3	21.0±0.2	19.4±0.3	22.5±0.2
		49	53	68	73	Increase from 0 day(%)
Control		22.3±0.5	20.3±0.6	21.6±0.4	22.6±0.4	16.5
<i>Hominis placenta</i>		22.8±0.3	21.3±0.2	22.6±0.8	22.4±0.6	28.0
Cyclophosphamide		23.2±0.2	21.3±0.3	22.5±0.7	22.5±0.7	24.3

Values represents the mean±S.E. (n=4).

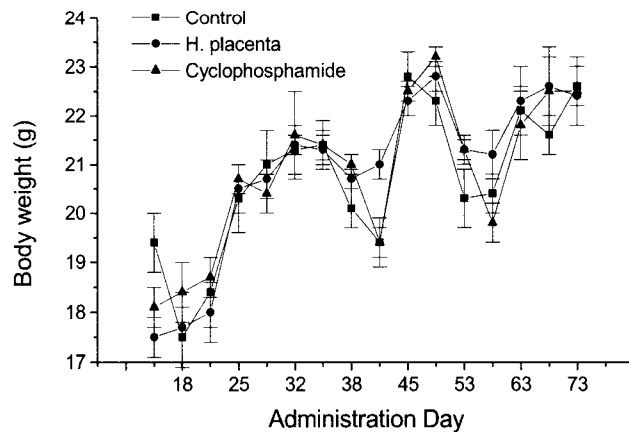


Fig. 1. Body weight change of type II collagen induced arthritis in mice

Values represents the mean±S.E. (n=4).

Table 2. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on the clinical severity of arthritis scored every one Week for 10weeks(unit : severity score)

Group	Week					
	0	1	2	3	4	5
Control	0	0	0	0	0.50±0.29	1.50±0.29
<i>Hominis placenta</i>	0	0	0	0	0	0.75±0.25
Cyclophosphamide	0	0	0	0	0	0.25±0.25
	6	7	8	9	10	
Control	1.50±0.29	2.00±0.25	2.25±0.48	2.25±0.48	2.25±0.48	
<i>Hominis placenta</i>	1.00±0.41	1.25±0.25	1.20±0.41	1.25±0.25	1.00±0.25	
Cyclophosphamide	0.50±0.29	0.50±0.29	0.25±0.25	0.25±0.25	0.25±0.25	

Values represents the mean±S.E.(n=4).

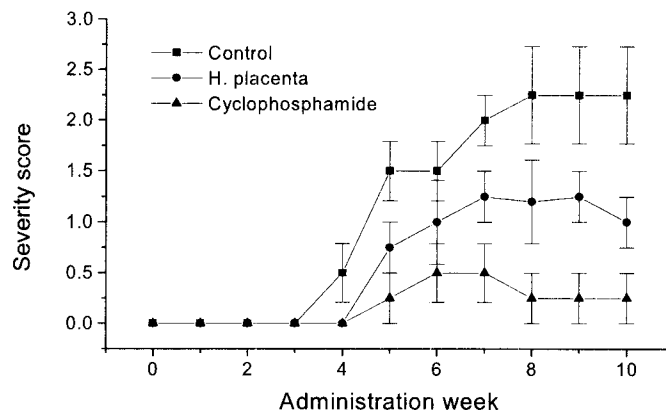


Fig. 2. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on the clinical severity of arthritis scored every one Week for 10 weeks

Values represents the mean±S.E.(n=4).

Table 3. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on vascular permeability in mice

Group	permeabilized dye($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	inhibition(%)
Control	76.5±9.7	-
<i>Hominis placenta</i>	68.7±7.5	10.2
Ibuprofen	54.7±4.8*	28.5

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* $p < 0.05$: Significantly different from the control group.

성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

2. 모세혈관투과성에 미치는 영향

대조군은 76.5±9.7 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 인데 비해 자하거 약침

군은 68.7±7.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 로서 대조군에 비해 10.2%의 투과성 억제효과를 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다. 양성대조군은 54.7±4.8 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 로서 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 억제율(28.5%)을 나타내었다 (Table 3, Fig. 3).

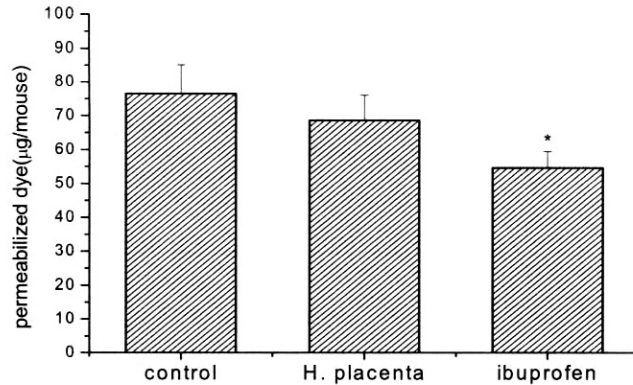


Fig. 3. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on vascular permeability in mice
 Values represents the mean±S.E.(n=7).
 * p<0.05 : Significantly different from the control group.

Table 4. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on phenyl benzoquinone-induced writhing in mice

Group	writhing frequency	writhing latency(sec)	inhibition(%)
Control	9.7±1.2	146.5±28.5	-
<i>Hominis placenta</i>	1.4±0.9*	168.6±20.3*	85.5
Acetaminophen	2.5±0.7*	385.6±56.8	74.2

Inhibition (%) means the inhibition rate on writhing frequency.
 Values represents the mean±S.E.(n=7).
 * p<0.05 : Significantly different from the control group.

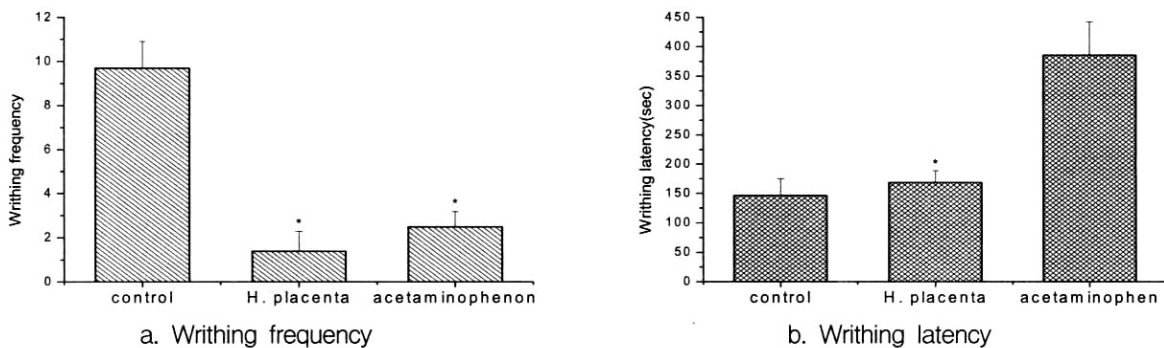


Fig. 4. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on phenyl benzoquinone-induced writhing in mice
 Values represents the mean±S.E.(n=7).
 * p<0.05 : Significantly different from the control group.

3. 염증동통 억제효과

1) Phenyl benzoquinone 유발 통증 억제효과

Writhing frequency 측정에서 대조군의 stretch 횟수 9.7±1.2회에 비하여 자하거 약침군은 1.4±0.9회로 유

의성(p<0.05) 있는 억제율(85.5%)이 관찰되었으며 양성 대조군 또한 2.5±0.7회로 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 억제율(74.2%)이 관찰되었다. Writhing latency 측정에서 자하거약침군은 대조군 146.5±28.5초에 비하여 168.6±20.3초로 유의성(p<0.05)있는 변화가 나타났다. 양성대조군은 유의성이 인정되지 않았다(Table 4, Fig. 4).

Table 5. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on pain sensitivity by hot plate test in mice

Group	jump latency(sec)	inhibition(%)
Control	18.5±2.2	-
<i>Hominis placenta</i>	25.4±1.7*	32.1
Acetaminophen	32.8±5.3	66.5

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

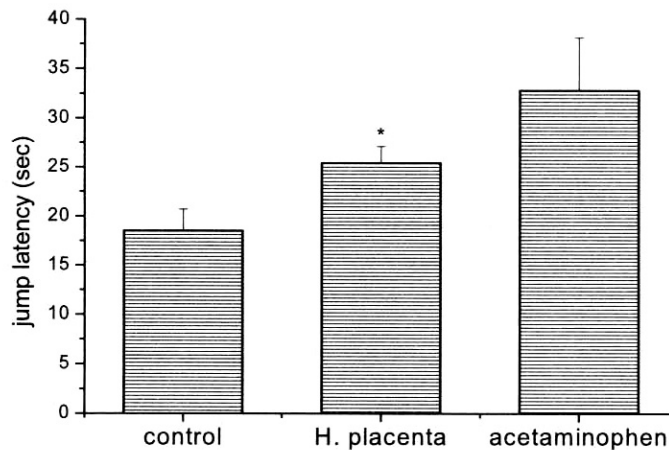


Fig. 5. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on pain sensitivity by hot plate test in mice

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

Table 6. Effect of *Hominis placenta* Herbal acupuncture on carbon clearance in mice

Group	regression coefficient	effect(%)
Control	1.0	-
<i>Hominis placenta</i>	1.08	8.0
Zymosan	1.18	18.0

2) Hot plate 유발 통증 억제효과

대조군의 jump시간은 18.5±2.2sec인데 비하여 자하거 약침군은 25.4±1.7초로 유의성(p<0.05) 있는 억제율(32.1%)을 나타내었다. 양성대조군은 32.8±5.3초로 대조군에 비해 유의성이 없었다(Table 5, Fig. 5).

4. 면역력 강화 효과

자하거 약침액의 면역증강 여부를 확인하기 위하여 Carbon clearance test를 실시하였는데 시간변동에

따른 rotring ink의 흡광도가 감소하여 면역증강 작용이 인정되었다. 대조군과 비교한 regression coefficient가 자하거 약침액은 1.08로 나타나 8% 정도의 면역강화 효과가 있음을 알 수 있었다(Table 6, Fig. 6).

5. Prostaglandin E₂의 함량변화

PGE₂ 유발물질인 LPS를 투여하지 않은 mouse의 macrophage cell에는 2.4±0.2ng/ml의 PGE₂가 들어 있었으나 LPS를 투여한 mouse에는 6.9±1.5ng/ml로 PGE₂

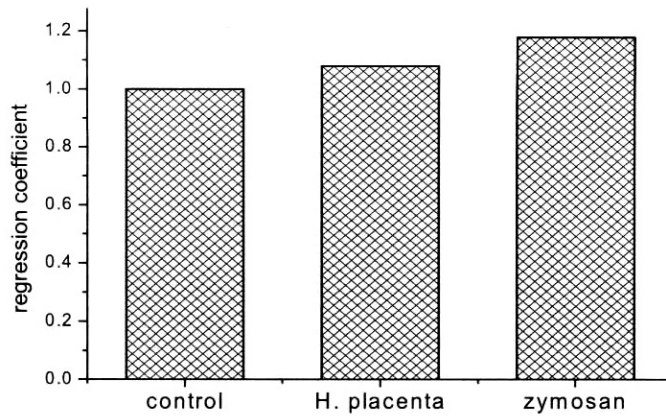


Fig. 6. Effect of *Hominis placenta* Herbal acupuncture on carbon clearance in mice

Table 7. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on PGE₂ content in mouse macrophage cells

Group	PGE ₂ content(ng/ml)	inhibition(%)
Normal	2.4±0.2	-
Control(LPS)	6.9±1.5	-
<i>Hominis placenta</i>	6.2±1.3*	10.1

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

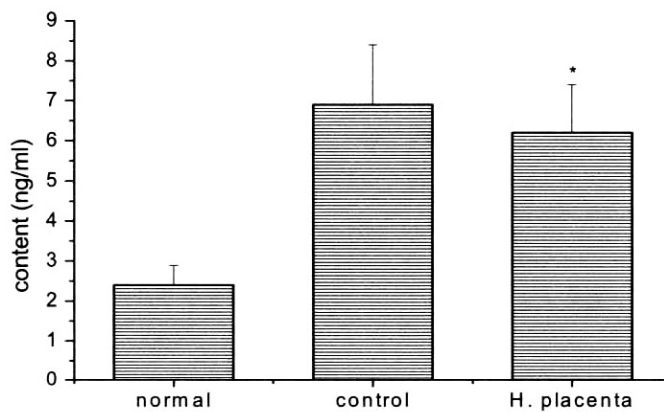


Fig. 7. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on PGE₂ content in mouse macrophage cells

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

가 크게 증가하였음을 볼 수 있었다. 그러나 자하거약침군에서는 6.2±1.3ng/ml로 10.1%의 유의성(p<0.05)있는 감소를 보여주어 자하거 약침이 염증유발물질을 효과적으로 억제함으로써 항염증작용이 있음을 알 수 있었다(Table 7, Fig. 7).

6. Cyclooxygenase-2 억제 활성

t-BHP로 염증을 유발한 대조군은 COX-2 level이 248±18.9로서 정상군 100±8.0에 비하여 현저히 증가하였다. 자하거 약침군은 대조군에 비하여 COX-2 level이 158±10.8로 유의성(p<0.05)있는 억제율(36.3%)을 보

Table 8. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on COX-2 activity

Group	COX-2 level	inhibition (%)
Normal	100±8.0	-
Control (t-BHP)	248±18.9	-
<i>Hominis placenta</i>	158±10.8*	36.3
Aspirin	43±7.8*	82.7

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

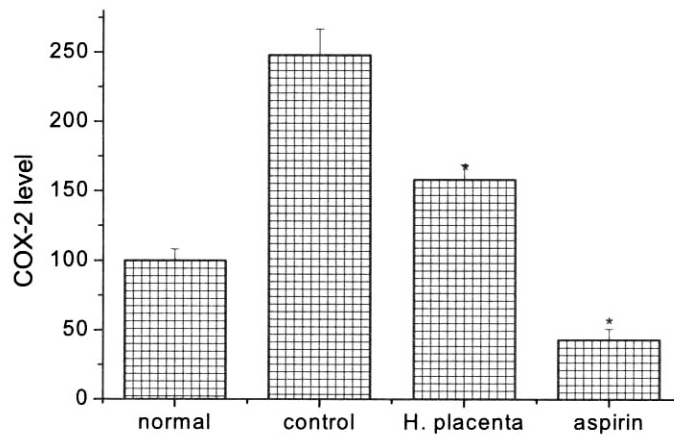


Fig. 8. Effect of *Hominis placenta* herbal acupuncture on COX-2 activity

Values represents the mean±S.E.(n=7).

* p<0.05 : Significantly different from the control group.

였다. 양성대조군은 또한 43±7.8로 유의성(p<0.05) 있는 82.7%의 억제율을 나타내었다(Table 8, Fig. 8).

IV. 考 察

한의학에서 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis, RA)이란 명칭을 직접 언급한 바는 없지만 문헌에 기록된 증상으로 미루어 볼 때 痺證, 痺痛, 歷節風과 같은 病證과 매우 흡사하며, 발병원인은 風·寒·濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다. RA와 유사한 증상이 《金匱要略》에 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體尪羸, 脚腫如脫”이라고 최초로 기록된 것으로 미루어 볼 때 歷節風, 白虎病, 白虎歷節風, 類風濕性關節炎, 痺症의 범주에 속한다고 볼 수 있다. 邪氣의 침입은 대체로 생체의 正氣가 허약한 경우에 발생하는데 正氣는 인체가 정상적인 생리기능

을 영위하는 필수 조건이며 邪氣에 저항하는 기능을 수행하므로 면역기능을 대변하는 한의학적 개념이라고 볼 수 있다. 또 肝과 腎은 藏血과 藏精의 臟腑로서 精血은 正氣의 근원이 되므로 생체의 면역체계에 중요한 영향을 미치게 된다. 한편 한의학에서는 腎主骨, 肝主筋의 이론을 근간으로 臟腑辨證에 따라 肝腎의 虛實과 精(氣)血의 盛衰를 조절하는 방법이 근골격계 질환을 치료함에 있어서 기본적인 원칙으로 제시되기도 하였다¹⁾.

류마티스의 특징은 급성 염증이 여러 관절에 영향을 미쳐 synovial hyperplasia를 야기하며 궁극적으로는 관절 파괴와 관절변형을 일으키는 것이다. 최근 골 재생과 골손실의 기전은 점차 밝혀지고 있으나 아직 류마티스의 발병원인은 명확하지 않다. 다만 류마티스와 염증 동물모델에서 골침식증 부위에 파골세포들이 출현하는 것은 파골세포의 분화와 활성화를 유발하는 osteotrophic factor들이 관절 침식의 원인에 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 추정하고 있다^{2,3)}. 그리

고 파골세포의 분화와 활성화를 조절하는 인자로 cytokine류 및 hormone, 예를 들어 M-CSF, TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-17, calcitonin, estrogen 등이 알려져 있으며 최근에는 RANKL가 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되었다^{4,5)}.

현재 류마티스의 약물 치료방법으로 항류마티스 약물, 비스테로이드성 소염제(NSAIDs), 스테로이드성 약물 등이 있으며 최근에는 TNF- α 중화 요법을 methotrexate와 병용하면 임상적으로 유효한 것으로 보고되어 있다⁶⁾. 그러나 이들 약물을 장기간 사용했을 때의 효용성에 대해서는 아직 증명되지 않았으며, 부작용도 다수 보고되었다. 따라서 관절염 초기와 달리 장기간 투여에는 많은 제약이 따르고 있다.

자하거(*Hominis Placenta*)¹⁹⁾는 사람의 태반을 건조시킨 것으로, 唐代의 《本草拾遺》에 처음으로 기록되어 있다²⁰⁾. 자하거의 性은 溫하며 味는 甘, 鹹, 無毒하다. 歸經은 肺, 肝, 腎 三經이며 補精益陽, 養血益氣하여 肺, 肝, 腎 계통의 허손질환을 치료하는 데에 활용되었다⁷⁾.

《東醫寶鑑》²¹⁾에서는 “紫河車卽人胎衣也主癡狂健忘怔忡失志及恍惚驚怖心神不守多言不定大能安心養血定神蒸熟入藥丸服或蒸熟單服之亦佳”라고 기록하였으며, 대부분의 문헌에서 虛損을 補益하고 氣血과 精을 補하여 血氣羸瘦, 婦人勞損, 面黧皮黑, 腹內諸病漸瘦悴者, 治虛損勞極, 癩癩, 失志恍惚, 療諸虛百損, 勞瘵傳戶, 治五勞七傷, 骨蒸潮熱, 喉咳音啞, 體瘦髮枯, 吐血來紅, 凡骨蒸盜汗, 腰痛膝軟, 體瘦精枯, 神傷夢遺, 不孕, 陽萎, 腰痠耳鳴, 虛勞, 咳血, 盜汗, 定喘, 頭目眩暈, 氣血不足, 面色萎黃, 倦怠無力, 肺虛咳嗽 등을 치료한다고 기록되어 있다²²⁻²⁵⁾.

자하거에는 간세포증식인자(HGF), 상피세포증식인자(EGF), 신경세포증식인자(NGF), 코로니 형성자극인자(CSF), 각종 interleukin, 각종 interferon, globulin (특히 immuno-globulin) 등의 각종 세포 증식인자가 있으며, gonadotropin, prolactin, thyroid stimulating hormone, steroid hormone, prostaglandin, 각종 효소(lysozyme, kininase, histaminase 등, erythropoietin, phospholipid, 각종 다당류 등의 성분을 함유하고 있다²⁴⁾. 그 약리 작용은 조직재생작용, 항감염작용, 항체형성 촉진작용, 저항력 부활작용, 호르몬 유사작용, 혈액응고증 부활작용, 항알레르기, 체질개선, 항스트레스, 신경안정화 작용 등이 있다고 알려져 있다²⁵⁾.

자하거 약침의 효과 연구로는 Apoptosis에 대한 보호효과²⁷⁾, 골다공증에 미치는 영향^{28,29)}, 난소적출 백서

의 성 호르몬 및 지질함량에 미치는 영향³⁰⁾, Bells palsy에 대한 치험보고³¹⁾ 등이 있으며, 본 연구와 관련된 관절염에 관한 효과 연구로서는 흰쥐의 adjuvant 유발 관절염에 대한 효과와 cytokines 억제효과 등⁸⁾이 보고되었으며 염증물질의 면역화학적 조사⁹⁾와 LPS 유발 관절염에서의 조직손상 완화, cytokines 억제 및 iNOS 효소활성 억제효과 등¹⁰⁾의 결과가 보고되고 있다.

따라서 조직재생과 항염증작용이 있으며 肝, 腎의 허손을 보충하여 腰痛膝軟, 體瘦精枯, 腰痠에 응용된 자하거는 허손병에 해당하는 류마티스 관절염의 치료에 효과가 있을 것으로 사료되어 본 실험을 진행하였다.

먼저 Collagen 유발 관절염의 억제효과를 관찰하였다. 쥐의 collagen 유발 관절염 모델은 synovitis, pannus formation, cartilage erosion 등의 여러 가지의 형태학적 소견이 인간의 류마티스 질환과 유사하여 류마티스의 실험적 모델로 많이 사용되고 있다. Tak 등³²⁾은 관절염이 진행됨에 따라 체중증가가 둔화된다는 보고를 하였다. 따라서 관절염을 유발시키는 기간 동안 실험동물의 체중변화를 3일 간격으로 73일간 관찰한 결과, 대조군과 양성대조군의 체중은 변화폭이 컸으나 자하거 약침군의 체중은 변화폭이 크지 않고 안정된 변화를 나타내었다. 체중증가에 있어서는 관절염이 유발된 대조군이 첫날에 비해 73일째 체중증가가 16.5%로 적었으며 자하거 약침군과 양성대조군은 각각 28.0%와 24.3%를 보여 자하거 약침 투여시 정상적인 체중변화를 보이는 것으로 나타났다.

직접적인 관절염 억제효과는 collagen을 2회 투여하여 만성관절염을 유발시킨 다음, 1주일 간격으로 관절염 치료효과를 관찰하였다. 대조군은 4주째부터 관절염 증상이 나타나기 시작하여 8주째 가장 심한 증상을 보였으며 그 이후에는 증상이 비슷하게 지속되었다. 자하거 약침군은 5주째부터 약간의 증상을 보이기 시작하였으나 그 증상은 대조군보다 훨씬 약하였으며 7주째부터는 더 이상 악화되지 않았고 10주째는 증상이 감소하기 시작하였다. 모든 기간의 효과에서 유의성은 없었으나 대조군과는 많은 차이를 보여주었다. 한편, 양성대조군은 자하거 약침군보다도 더 우수한 효과를 나타내었으나 역시 유의성은 없었다.

다음으로 자하거 약침이 모세혈관투과성에 미치는 영향을 관찰하였다. 류마티스성 관절에서 결합조직의 변화는 모세혈관의 손상 및 synovial cell의 증식으로 시작되며 이때 결합조직 안쪽으로 lymphocyte의 침윤이 생기면서 fibroblast 및 macrophage들이 증가하

고 lymphocyte와 monocyte의 세포성 면역반응이 강하게 일어난다. 대조군은 복강 내로 투과된 Evans blue 색소량이 $76.5 \pm 9.7 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 인데 비해 자하거 약침군은 $68.7 \pm 7.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 로서 대조군에 비해 10.2%의 투과성 억제효과를 나타내어 자하거 약침이 염증 초기 단계에서 모세혈관투과성이 증가되는 것을 억제하는 효과가 있었으나 유의성은 인정되지 않았다. 양성대조군은 $54.7 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 로서 대조군에 비해 28.5%의 억제효과를 나타내었다.

Phenyl benzoquinone 유발 통증과 hot plate 유발 통증을 통해 염증동통 억제효과를 관찰하였다. 일반적으로 통증모델에서는 통증유발인자로는 화학적 자극제인 phenyl benzoquinone이나 acetic acid를 사용한 Writhing test와 물리자극(열자극)을 이용한 Hot plate test를 실시하고 있다. Writhing을 일으키는 자극제로 ephedrine, bradykinin, hypertonic saline, 5-hydroxytryptamine(serotonin), histamine, HCl, acetic acid, reserpine, heparin, phenyl benzoquinone 등이 있으며 이들은 모두 조직손상에 의한 통증유발 물질들이다. 이 중에서 phenyl benzoquinone과 acetic acid가 비특이적 자극제로서 가장 consistent effect를 나타내는 것으로 알려져 있다. 자하거 약침 투여 후, phenyl benzoquinone에 의한 통증에 대하여 어느 정도의 진통효과를 보이는지를 측정하였다. 대조군의 stretch 횟수가 9.7 ± 1.2 회인데 비해 자하거 약침군은 1.4 ± 0.9 회로 85.5% 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타냈으며, 양성대조약물인 acetaminophen의 효과(74.2% 억제율)보다 더 우수하였다. 따라서 자하거 약침이 염증에 의한 통증을 억제하는 효과가 매우 강함을 알 수 있었다. 그리고 최초의 통증반응 시간은 대조군의 146.5 ± 28.5 초에서 168.6 ± 20.3 초로 통증을 인지하는 시간이 유의하게 ($p < 0.05$) 길어졌다. 동통 억제효과의 또 다른 시험법인 Hot plate test에서는 대조군의 jump시간은 18.5 ± 2.2 초인데 비하여 자하거 약침군은 25.4 ± 1.7 초로서 32.1%의 억제효과를 나타내었는데 이는 양성대조약물인 acetaminophen의 효과(66.5% 억제율)보다는 낮은 것이나 그 효과의 유의성($p < 0.05$)은 충분히 인정할 수 있었다.

다음으로 자하거 약침의 면역력 강화 효과를 측정하였다. 이 방법은 투여한 carbon suspension을 어느 정도 억제하는지를 지표로 하여 면역증강 여부를 관찰하는 방법이다. 자하거 약침은 3-12분 사이의 시간 변동에 따른 rotring ink의 흡광도가 감소하여 면역증강 작용이 인정되었다. 대조군과 비교한 regression coefficient가 자하거 약침은 1.08로 나타나 8% 정도

의 면역강화 효과가 있음을 알 수 있었다. 양성대조약물인 zymosan은 regression coefficient가 1.18로서 면역증강력이 자하거 약침보다 강하였다.

다음으로 PGE₂의 함량변화를 관찰하였다. PGE₂는 체내에서 arachidonic acid가 COX-2에 의해 대사된 다음, prostaglandin synthetase에 의해 생합성되는 염증성 물질의 하나이다. 자하거 약침의 항염증효과가 염증을 유발하는 prostaglandin화합물인 PGE₂의 억제에서 기인하는지를 확인하기 위하여 mouse의 macrophage cell 중의 PGE₂ 함량을 정량하였다. PGE₂ 유발물질인 LPS를 투여하지 않은 mouse의 macrophage cell에는 $2.4 \pm 0.2 \text{ng}/\text{ml}$ 의 PGE₂가 들어 있었으나 LPS를 투여한 mouse에는 $6.9 \pm 1.5 \text{ng}/\text{ml}$ 로 PGE₂가 크게 증가하였음을 볼 수 있었다. 그러나 자하거 약침군에서는 $6.2 \pm 1.3 \text{ng}/\text{ml}$ 로 10.1%의 유의한 감소($p < 0.05$)를 보여주어 자하거 약침이 염증유발물질을 효과적으로 억제함으로써 항염증작용이 있음을 알 수 있었다.

마지막으로 COX-2의 억제활성을 조사하였다. Cyclooxygenase는 arachidonic acid의 분해대사에 관여하는 효소로서 COX-1과 COX-2의 두 종류가 있는데 COX-1은 위나 신장기능에 필요한 prostaglandin이며 COX-2는 염증시 국소적으로 발현하는 물질인 것으로 알려져 있다. 자하거 약침이 염증유발물질인 PGE₂의 함량을 억제하는 것으로 나타남에 따라 체내에서 PGE₂를 생성하여 염증을 유발하는 효소인 COX-2의 효소활성도가 자하거 약침에 의해 어떤 변화를 보이는지를 조사하였다. COX-2의 발현을 높이는 positive inducer로 *t*-BHP를 사용하였는데, 이 화합물은 활성산소종(ROS)과 관련하여 COX-2 발현과 ROS 저해 실험을 할 경우에 *t*-BHP 처리한 후 특정 약물을 사용하여 그 저해능을 보는 것으로 많이 응용되고 있다. *t*-BHP로 염증을 유발했을 때 정상군에 비해 COX-2가 크게 증가하였는데, 자하거 약침은 유발인에 의해 증가된 효소활성을 36.3% 저해하였다. 이 효과는 aspirin의 82.7%에 비해서는 낮았으나 유의성($p < 0.05$)이 인정되어 자하거가 효소활성을 억제함으로써 PGE₂생성을 억제하여 항염증 작용을 나타내는 것으로 분석된다.

이상의 결과, 자하거 약침은 콜라겐 유발 관절염의 진행을 억제시키고, 면역증강효과를 나타내었다. 염증 초기단계에서 모세혈관 투과성이 증가되는 것을 억제하며, 염증시 발현되는 통증을 경감시키며, 염증유발물질 및 염증유발물질 생성효소 활성을 저해하였다. 따라서 초기 염증을 감소시키며 동시에 질병진행을 막

아주어야 하는 류마티스 관절염의 치료에 자하거 약침이 도움이 될 것으로 기대되며, 여러 면역·염증 질환에 대한 효과도 지속적으로 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

紫河車 藥鍼을 collagen-유발 관절염 모델의 인체 족삼리(ST₃₆)에 상응하는 부위에 투여하여 관절염 억제효과, 모세혈관투과성 억제효과, 염증동통 억제효과, 면역력 강화효과, 염증유발물질 억제효과 및 염증유발물질 생성 효소활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자하거 약침은 관절염에 의한 체중증가를 억제하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다.
2. 자하거 약침은 모세혈관투과성 실험에서 염증 초기단계의 염증발현을 10.2% 정도 억제하였다.
3. 자하거 약침은 phenyl benzoquinone과 hot plate test 실험에서 염증에 의한 동통 억제 효과가 인정되었다.
4. 자하거 약침은 면역증강효과를 나타내었으나 그 효과는 8% 정도로 양성대조군에 비해 미약하였다.
5. 자하거 약침은 염증유발물질인 PGE₂의 생성을 10.1% 정도 억제함으로써 항염증효과를 나타내었다.
6. 자하거 약침은 PGE₂를 생성하는 효소인 COX-2의 효소활성도를 36.3% 저해하여 염증유발물질 억제에 의한 항염증작용을 나타내었다.

VI. 參考文獻

1. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 177-96.
2. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 ; 43 : 259-69.
3. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Talfuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohasi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999 ; 402 : 304-9.
4. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 ; 93(2) : 165-76.
5. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 1998 ; 95(7) : 3597-602.
6. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *New Eng J Med.* 2000 ; 343(22) : 1594-602.
7. 이상길, 이재동, 고희균, 박동석, 이운호, 강성길. 자하거약침제제에 대한 고찰. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 67-74.
8. Yeom MJ, Kang JE, Hahm DH, Park HJ, Lee EJ, Shim IS, Lee HJ. 흰쥐의 Adjuvant 유발 관절염에 대한 자하거 약침의 효과. 대한약침학회지. 2002 ; 5(1) : 91-103.
9. Yeom MJ, Lee HC, Kim GH, Shim IS, Lee HJ, Hahm DH. Therapeutic effects of Hominis pla-

- centa injection into an acupuncture point on the inflammatory responses in subchondral bone region of adjuvant-induced polyarthritis rats. *Biol Pharm Bull.* 2003 ; 26 : 1472-7.
10. 박기범, 백승태, 이승덕, 김경호, 김갑성. 자하거 약침의 항염증능이 LPS 유발 관절염 치료에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2006 ; 23(6) : 103-16.
 11. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 ; 89 : 9784-8.
 12. Whittle BA. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br J Pharmacol Chemother.* 1964 ; 22 : 246-53.
 13. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957 ; 25 : 729-31.
 14. Hendershot LC, Forsaith J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J Pharm Exptl Ther.* 1959 ; 125 : 237-40.
 15. Kissel JW, Albert JR, Boxil GC. The pharmacology of prodilidine hydrochloride, a new analgesic agent. *J Pharm Exptl Ther.* 1961 ; 134 : 332-10.
 16. Parkes MW, Pickens JT. Conditions influencing the inhibition, by analgesic drugs, of the response to intraperitoneal injections of phenylbenzoquinone in mice. *Brit J Pharmacol.* 1965 ; 25 : 81-7.
 17. Suh HH, Tseng LF. Intrathecal β -funaltrexamine antagonizes intracerebroventricular β -endorphin but morphine-induced analgesia in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 ; 245 : 587-93.
 18. Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, Jurcic K, Le Turdu M, Heur YH. Immunostimulating polysaccharides(heteroglycans) from higher plants. Preliminary communication. *Arzneimittel-Forschung.* 1984 ; 34(6) : 659-61.
 19. 傳統醫學研究所. 本草藥材圖鑑. 서울 : 成輔社. 1994 : 329.
 20. 洪元植. 中國醫學史. 서울 : 東洋醫學研究院. 1987 : 112-3.
 21. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 서울 : 법인문화사, 1999 : 208.
 22. 李時珍. 本草綱目(校正本). 서울 : 醫聖堂. 1993 : 2963-6.
 23. 高本鈞. 新編中藥大辭典 第二冊. 中華民國 : 新文豐出版公司. 1982 : 1792.
 24. 신민교, 김창민, 안덕균, 이경순. 中藥大辭典. 서울 : 도서출판 정담. 1998 : 4676.
 25. 蔡永敏 主編. 中藥藥名辭典. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1996 : 340.
 26. 대한약침학회. 약침요법 기술지침서. 서울 : 대한약침학회. 2000 : 184-5.
 27. 서정철, 이재동, 박동석, 강성길, 안병철, 김이화, 김순애. 자하거 약침액이 과산화수소로 유발된 송과선 세포의 Apoptosis에 대한 보호효과. *대한침구학회지.* 2001 ; 18(3) : 69-78.
 28. 육태한, 이창현, 이학인. 홍화자 녹용 자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2001 ; 18(1) : 61-75.
 29. 장수진, 이창현, 육태한. 자하거(紫河車) · 녹용(鹿茸) · 홍화자(紅花子) 약침액이 난소적출로 골다공증을 유도한 흰쥐에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1998 ; 19(1) : 5-18.
 30. 정병문, 진천식. 자하거가 난소적출 백서의 성호르몬 및 지질함량에 미치는 영향. *대한한방부인과회지.* 2001 ; 14(1) : 103-17.
 31. 윤정훈, 육태한, 송범용. 자하거약침의 Bells palsy에 대한 치험보고. *대한약침학회지.* 2000 ; 3(1) : 89-99.
 32. Tak PP, Klapwijk MS, Broersen SFM, van de Greest DA, Overbeek M, Firestein GS. Apoptosis and p53 expression in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Res.* 2000 ; 2 : 229-35.