

원저

## 위령선약침이 Collagen, Adjuvant, LPS 및 PLA2 유발 류머티스성 관절염에 미치는 영향

이진석 · 김경호 · 이승덕 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### The Effect of *Clematidis* Radix Herbal-acupuncture Solution, on Collagen, Adjuvant, Lipopolysaccharide and Phospholipase A<sub>2</sub> Induced Rheumatoid Arthritis in Mice

Lee Jin-seok, Kim Kyung-ho, Lee Seung-deok and Kim Kap-sung

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

**Objectives** : The purpose of this study is to investigate the effect of *Clematidis* radix herbal-acupuncture solution, on collagen, adjuvant, lipopolysaccharide and phospholipase A<sub>2</sub> induced rheumatoid arthritis in mice.

**Methods** : Arthritis index was measured for mouse that was injected subcutaneously in solution mixed chicken type II collagen with Freund's complete adjuvant. We injected Freund's complete adjuvant into right posterior part of the sole of a ICR mouse foot, which was measured by plethysmometer. The solution mixed *CRHS* with Tris-HCl, CaCl<sub>2</sub>, substrate, enzyme was done a chemical action for thirty minutes, and then inhibitory activity of PLA<sub>2</sub> enzyme was expressed with inhibition percentage by utilizing isolated arachidonic acid. COX-2 was induced by adding LPS to RAW 264.7 cell, and COX-2 activity was measured by western blot analysis and PGE<sub>2</sub> Biotrak kit.

**Results** : *CRHS* also inhibited Freund's complete adjuvant induced chronic rheumatoid arthritis in mice. *CRHS* showed significant inhibition of type I and type II PLA<sub>2</sub> activities in a dose dependent manner. Furthermore, PGE<sub>2</sub> production was decreased with *CRHS* and lipopolysaccharide-induced COX-2 protein expression was significantly inhibited by *CRHS*.

**Conclusions** : These results suggest that *CRHS* has an therapeutic effect on drug induced-rheumatic

· 접수 : 2012. 2. 8. · 수정 : 2012. 2. 12. · 채택 : 2012. 2. 12.  
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 부속한방병원 침구과  
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

arthritis by inhibiting PLA<sub>2</sub> and COX-2 activities.

**Key Words** : rheumatoid arthritis, *Clematidis radix* herbal-acupuncture solution (CRHS), phospholipase A<sub>2</sub> activity, cyclooxygenase-2

## I. 서론

류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 염증세포의 침윤과 활막의 현저한 이상증식으로 결국에는 뼈와 관절이 파괴되는 만성 염증성 관절 질환이면서 류머티스인자와 같은 자가항체생성을 특징으로 한다. 또한 관절동통, 부종, 경직, 운동제한 및 기능실조 등의 증상을 나타내는<sup>1,2)</sup> 만성적이고 전신적인 염증성 질환으로, 활액막의 비후와 임파구의 침윤이 나타나<sup>3)</sup> 자가면역질환의 일종으로 여겨지고 있다<sup>4)</sup>.

류머티스성 관절염의 원인은 아직 규명되지 않고 있으나, 류머티스성 관절염 환자의 염증부위로부터 분리한 macrophage에서 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )를 비롯한 다양한 염증성 cytokine의 분비가 증가되는 것이 관찰되고 있으며, 이러한 염증화 과정에 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 관계하여 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의한 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성이 증가한다는 사실들이 밝혀지고 있다<sup>5,6)</sup>. 현재 치료목적으로 사용되는 신약의 경우 대다수의 환자가 위장관 증상을 호소하고 이중 일부에서는 위장관 출혈이나 천공 등의 합병증으로 인하여 생명의 위협을 받는 경우도 있다. 장기간 약물치료를 지속해야하는 만성 질환이라는 점에서 효능이 극대화되고 부작용이 적은 제재 개발이 필요한 실정이다.

한의학에서 류머티스성 관절염은 痺證, 痺痛, 歷節風과 같은 病症과 매우 흡사하며, 발병원인은 風·寒·濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다<sup>7)</sup>. 특히 痺證은 주요증상이 痛症이며 병리적으로 氣血不通하여 나타나는 것이므로 각종 痺證의 공통적인 치법은 宣通시키는 것이며, 氣血과 營衛가 循行하면 痺痛은 자연스럽게 소실되는데, 風寒濕痺는 辛溫한 약물로 陽氣를 고조시켜 邪氣를 逐出하고, 風熱濕痺는 散風清熱祛濕시키며, 虛한 사람의 久痺는 溫通溫散 혹은 滋陰시킨다<sup>8)</sup>.

최근 약침을 사용한 관절염 관련 논문을 살펴보면

桂枝<sup>9)</sup>, 黃柏<sup>10)</sup>, 防己<sup>11)</sup>, 牛膝<sup>12)</sup>등을 약침으로 만들어 RA관련 cytokine과 활막 내 면역학적 변화를 연구한 바가 있다.

威靈仙은 性은 溫, 味는 辛鹹하며 祛風除濕, 通絡止痛하는 효능으로 風濕痺痛, 肢體麻木, 筋脈拘攣 등을 치료하는데 상용되는 약물로<sup>13)</sup>, 관절염에 대한 항염증효과를 밝힌 연구들이 다수 진행되었으나<sup>14-16)</sup>. Type II collagen, Freund's complete adjuvant, LPS 및 phospholipase A<sub>2</sub>로 유도된 류머티스성 관절염에 대한 동물실험 연구는 없었다.

이에 저자는 위령선(*Clematidis radix*)을 사용하여 약침액을 제조하고, mouse를 대상으로 type II collagen, Freund's complete adjuvant, lipopolysaccharide (LPS) 및 phospholipase A<sub>2</sub> 유도 류마티스 관절염을 유발한 후 위령선약침액(*Clematidis radix* herbal-acupuncture solution, CRHS)을 투여하여 관절염에 미치는 영향과 기전을 탐색한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 동물

태령 5주령의 체중 20~25g의 DBA/1JCrj (H-2q) 암컷 mouse (Charles Liver, 일본)를 사용하였으며, 동국대학교 의과대학(경주시, 경북) 동물사육실에서 일정한 조건(온도 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 습도 40~60%)하에서 2주 일 적응시켜 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 위령선(*Clematidis radix*)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였으며 추출에 사용한 물은 3차 증류수를 사용하였

다. Voucher specimen은 동국대학교 일산한방병원 침구과에 보관되어 있다.

### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), chicken type II collagen, ibuprofen, porcine pancreas phospholipase A2, Crotalus atrox phospholipase A2, lipopolysaccharide(E. Coli), NS398, bicinchoninic acid protein kit들과 adjuvant의 주성분인 열-약화시킨 Mycobacterium tuberculosis는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 제일생명공학서비스(Daegu, Korea)에서 그리고 그 외의 모든 시약들은 모두 특급제품을 사용하였다. 또한 1-stearoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]arachidonyl-sn-glycerophosphocholine과 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 측정에 사용한 enzyme immunoassay kit는 Amersham Pharmacia Biosciences (Arlington Heights, IL, USA)의 제품을 사용하였으며, 1,4-bis [2-(phenyloxazolyl)] benzene (POPOP) 및 2,5-diphenyloxazole (DPO)는 Dojin사(Dojin Chem. Co., Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다.

한편 사용기기로서 rotary evaporator는 BUCHI사(BUCHI RE121, Switzerland), CO<sub>2</sub> 배양기는 Vison사(Vision Biotech, VS-9180, Korea), UV spectrophotometer는 Gilford사(Gilford, Response<sup>TM</sup>, USA), ELISA reader는 Molecular Devices사(VERSA max, USA)의 제품을 각각 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 위령선약침액(*Clematidis radix* herbal-acupuncture solution, CRHS)의 제조

본 실험에서는 水製-alcohol 沈法<sup>17)</sup>에 의해 위령선 약침액을 제조하였다. 위령선 60g을 수직으로 환류냉각관이 부착된 원저 flask에 넣고, 증류수 400 ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 그 후 여과액 중에 남아 있는 미량의 침전물을 제거하기 위해 4°C에서 2,500 rpm으로 10분간 원심분리하여, 그 상층액을 취하였다. 상층액을 다시 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)로 감압농축하고, 농축액에 증류수를 가하여 전량을 50 ml가 되도록 한 다음, membrane filter (0.22 μm, Whatman<sup>®</sup>, Germany)로 여

과하였다. 위의 방법으로 제조한 위령선 추출액 50 ml에 ethanol을 가하여 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 이때 ethanol은 99.9% ethanol을 사용하였으며, 첨가량은 위령선 추출액이 단계별로 75, 85 및 95% ethanol 용액이 되게 하면서 침전물을 제거한 다음, 감압농축하였다. 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절하여 전량이 200ml가 되게 한 다음 저온에서 24시간 방치한 후, membrane filter(0.22 μm, Whatman<sup>®</sup>, Germany)로 여과하여 위령선약침액의 원액(×1)으로 사용하였으며 필요에 따라 2배 희석(×0.5) 및 10배 희석(×0.1)하여 사용하였다. 한편 ×1농도의 위령선약침액 100 ml를 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량을 측정한 결과 810 mg의 건조 엑기스를 얻었다.

### 2) 세포배양

계대 보존중인 Raw 264.7 세포를 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM을 배양액으로 하여 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 2일 또는 3일간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체 질소에 보관해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion방법으로 확인하였다.

### 3) Collagen induced arthritis (CIA) 유발 및 치료혈 선택

Durie 등의 방법<sup>18)</sup>으로 위령선약침액의 collagen induced arthritis에 대한 억제효과를 실험하였다. Chicken type II collagen을 0.01N acetic acid에 녹여 2mg/ml의 농도가 되도록 한 후 4°C에서 18시간 정도 저어준 다음 동량의 complete Freund's adjuvant를 섞어 emulsion화 하였다. 이를 0.2ml씩 mouse에 피하주사(subcutaneous injection, s.c.)하였으며 처음 주사하고 제2주와 제4주 후에 각각 incomplete Freund's adjuvant를 사용하여 위와 동일한 방법으로 추가면역(booster)하였다(총 3회). 대조약물로는 dexamethasone (1mg/kg)을 복강 내로 주 2회 투여하였다. 이들 그룹은 모두 실험 시작 후 관절염의 발생과 중증도를 9주까지 관찰하였다. 또한 류머티스성 관절염 치료효과를 검토하기 위해 위령선약침액의 투여는 중완(中腕, CV<sub>12</sub>)혈을 선택하였으며 투여 용량은 각각의 농도(×0.05, ×0.1 및 ×0.5)를 100μl씩 주 3회씩 주입하였다(Table 1).

Table 1. Classification of Experimental Groups

Experimental groups	Numbers	Application part	Medication volume/mouse	Medication period
Collagen injection group	7	Subcutaneous injection(s.c.)	0.2 ml	3 times
Dexamethasone injection group after collagen injection	7	Intraperitoneal injection(i.p.)	1 mg/kg	twice per week
CHRS injection group	×0.05	<i>Chung-wan</i> (CV <sub>12</sub> )	0.1 ml	3 times per week
	×0.1	<i>Chung-wan</i> (CV <sub>12</sub> )	0.1 ml	3 times per week
	×0.5	<i>Chung-wan</i> (CV <sub>12</sub> )	0.1 ml	3 times per week

#### 4) Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향

체중 30g 내외의 자성 ICR mouse 7마리를 한 군으로 하여 Claude 등의 방법<sup>15)</sup>에 따라 실시하였다. 즉 Freund's complete adjuvant(*mycobacterium tuberculosis*) 50 µl/mouse를 mouse의 오른쪽 뒷 발바닥에 주사하고 18일째 이후부터 28일째 되는 날까지 검체를 투여하였으며, 약물투여 시작일부터 3일간격으로 10일간 plethysmometer로 족부종을 측정하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 사용하였다. Paw volume의 측정에는 plethysmometer(Mitutoyo Co., Japan)를 사용하였다.

#### 5) 관절염 발생률과 중증도의 평가

관절염의 중증도는 주 2회 육안으로 평가하였다<sup>19)</sup>.

Score 0 : 발에 아무런 질환이 발견되지 않는 정상적인 상태

Score 1 : 한두 개의 발가락에 종창을 동반한 홍반을 띠거나 최소한의 종창이 유발된 상태

Score 2 : 확실한 홍조를 띠거나 국부적 상지 종창, 그리고 이러한 것이 여러 발가락에서 관찰되는 경우

Score 3 : 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되며 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태

각각의 발에서 나타나는 score를 모두 합산하여 mouse의 CIA score로 나타내어 최소 0부터 최대 12의 값(arthritis index)으로 표현하였다.

#### 6) Cyclooxygenase-2 (COX-2)에 미치는 영향

##### ① COX-2 효소활성 측정

Raw 264.7 세포(5×10<sup>5</sup>cell/ml)를 12 well plate의 각 well에 2시간 부착시킨 후에 샘플을 농도별로 50 µl씩 가한다. 이를 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 다시 1시간 배양시킨 후 lipopolysaccharide (LPS, E. Coli) 100 ng/ml의 농도를 가하여 COX-2를 유도하였다. 이때 양성대조군으로는 NS-398 (5µM)을 사용하였다. 이를 12시간 동안 배양한 후 세포의 lysate를 준비하여 western blot분석에 사용하였고, 배양상층액은 회수하여 PGE<sub>2</sub> Biotrak kit (Amersham Biosciences)을 이용하여 COX-2 활성측정에 사용하였다. 즉 PGE<sub>2</sub> Biotrak kit (Amersham Biosciences)의 96 well plate에 이들 상층액 50 µl씩 가한 뒤, 희석한 mouse anti-PGE<sub>2</sub> antibody를 50 µl씩 넣었다. Peroxidase conjugated second antibody를 50 µl씩 가한 뒤 상온에서 2시간 배양시킨다. washing buffer로 4회 세척한 뒤 기질시약을 150 µl씩 가하고 상온에서 30분간 배양시키고 1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 사용하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

##### ② Western blot 분석

전기영동으로 분리한 단백질은 20% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 ponceau용액으로 이동 유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항

체와 막을 4시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 tris-tween buffered saline(TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고 재차 TTBS로 6회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 enhanced chemiluminescence용액으로 2분간 반응하고 Kodac 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하고 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

### 7) Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 활성에 미치는 영향

#### ① 기질의 조제

기질은 chloroform에 녹인 1-stearoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]arachidonyl-sn-glycerophosphocholine(1,000 cpm/nmol) 적당량을 시험관에 분취한 후 질소가스하에서 chloroform을 휘발시켜 lipid film을 만들고, 증류수를 가하여 심하게 교반한 다음, water bath형 ultrasonic cleaner (Branson 5200, USA)로 sonication하여 사용하였다.

#### ② 반응시간에 따른 PLA<sub>2</sub>의 활성 측정

본 실험을 위하여 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 기질 20 nmol 1-stearoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]arachidonyl-sn-glycerophosphocholine 및 porcine pancreas (group I PLA<sub>2</sub>)의 경우에는 30ng, Crotalus atrox (group II PLA<sub>2</sub>)의 경우에는 40 ng을 넣고 최종 용적을 0.2 ml로 한 다음, 37°C shaking waterbath에서 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140분 및 180분 동안 반응시키고 Dole's assay법<sup>20)</sup>으로 각각의 PLA<sub>2</sub>의 활성을 측정한다. 다음 반응시간을 결정하였다.

#### ③ I형 및 II형 PLA<sub>2</sub>의 활성에 미치는 위령선약침액의 영향

먼저 group I 형 PLA<sub>2</sub>의 활성측정을 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 각 농도별 위령선약침액 20 µl, 20 nmol의 기질 및 30 ng의 효소(porcine pancreas)를 함유한 최종 용적 0.2 ml를 반응액으로 조제하였다. 한편 group II형 PLA<sub>2</sub>의 활성측정 시에는 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 각 농도별 위령선약침액 20 µl, 20 nmol의 기질 및 40 ng의 효소(Crotalus atrox)를 함유한 최종 용적 0.2 ml를 반응액으로 조제하였다. 이와 같이 조제한 반응용액을 잘 혼합한 다음, 37°C shaking waterbath에서 30분간 반응시킨 후, 생성된 유리 지방산([<sup>14</sup>C]arachidonic

acid)을 Dole's reagent (1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : isopropyl alcohol : n-heptane = 2:78:20, v/v, %)를 넣어 반응을 정지시킨 다음, 연속적으로 n-heptane 및 증류수를 가하여 direct vortex mixer(Direct mixer TS-100, Japan)로 5분간 격렬하게 교반하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 n-heptane층을 아래층이 섞이지 않도록 취한 다음, 다시 동량의 n-heptane을 가하고 수분제거의 목적으로 silicagel (Kieselgel 60, Merck, USA)을 적당량 넣은 다음, 다시 격렬하게 섞고 원심분리하여 상층액을 liquid scintillation counter (Minaxi Tri-carb 4000, Packard, USA)로 유리된 [<sup>14</sup>C]arachidonic acid를 측정하여 PLA<sub>2</sub> 효소 억제활성을 % inhibition으로 환산하였다.

### 8) 통계처리

본 실험에서 얻은 실험군 간의 결과에 대하여 student's t-test를 실시하여 유의성을 검정하였으며, p값이 0.05이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

## III. 결 과

### 1. 위령선약침액이 collagen 유도 류머티스성 관절염에 미치는 영향

대조군에서는 시간이 가면서 관절염의 지수(arthritis index)가 계속 증가하는 양상을 나타내었다. 실험군 중

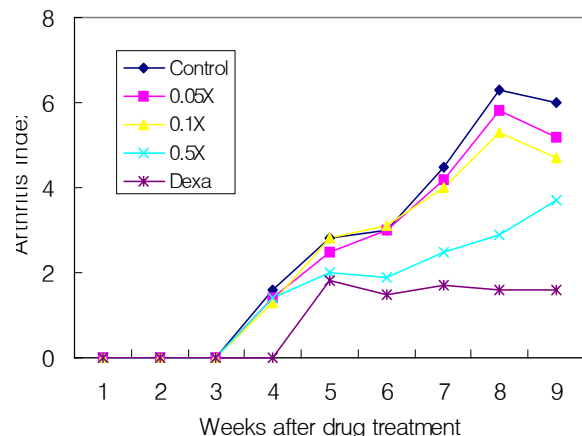


Fig. 1. Arthritis severity of the week after immunization with type II collagen

In ×0.5 CRHS treated group, suppression of arthritis were observed at 6-8weeks after type II collagen immunization.

×0.5 농도의 위령선약침액 군에서는 6주째부터 8주째 까지 음성대조군에 비해 감소하였다. 특히 6주째에는 양성대조약물인 dexamethasone에 상응하는 효과를 나타내었다. 그러나 ×0.05와 ×0.1 농도의 위령선 약침액군에서는 음성대조군에 비해 유의성 있는 감소를 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

## 2. 위령선약침액이 Freund's complete Adjuvant 유도 관절염에 미치는 영향

×0.1의 농도에서 6일째와 10일째 되는 날에 20.8% 및 20.2%의 억제효과가 나타났으며, 또한 ×0.5의 농도에서는 6일째와 10일째 되는 날에 25.4% 및 21.4%의 억제효과가 나타났으며, 양성대조약물인 ibuprofen 200 mg/kg에 버금가는 효능을 나타내었다(Table 2).

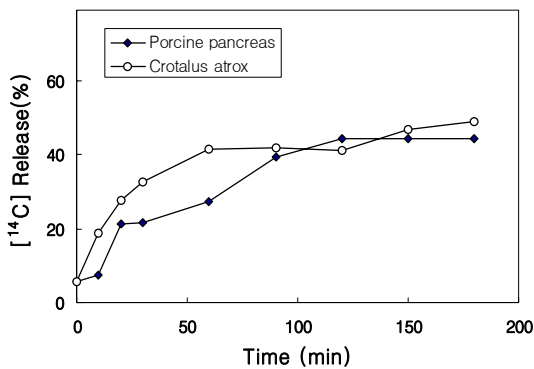


Fig. 2. Time course of *porcine pancreas* and *Crotalus Atriox* PLA2s activities

## 3. Phospholipase A<sub>2</sub> 활성에 미치는 영향

### 1) 반응시간에 따른 phospholipase(PL) A<sub>2</sub>의 활성측정

실험 결과 반응시간이 길어질수록 두 효소의 활성이 점차로 증가하였으며, 특히 *porcine pancreas*의 경우에는 반응 120분부터 plateau를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 각 효소에 의해 20~30%의 [<sup>14</sup>C] arachidonic acid 유리를 나타내는 30분으로 반응시간을 고정하고 이하의 실험을 진행하였다(Fig. 2).

### 2) I형 PLA<sub>2</sub>의 활성에 미치는 영향

×0.01 농도에서는 7.9%, ×0.05 농도에서는 19.6%, ×0.1 농도에서는 22.3% 그리고 ×0.5 농도에서는 33.4%의 PLA<sub>2</sub> 활성 억제효과를 보였으며, 특히 ×0.1과 ×0.5 농도에서 농도의존적으로 유의성 있는 저해효과를 나타내었다(Fig. 3).

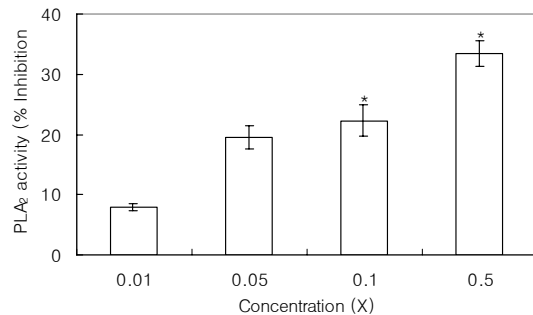


Fig. 3. Effect of *CRHS* on type I phospholipase A<sub>2</sub> activity

Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean(n=3).

\* :  $p < 0.05$  as compared to control.

Table 2. Effect of *CRHS* on Freund's Complete Adjuvant-induced Arthritis in Mice

Treatment	Dose	numbers	Increase % of paw volume <sup>a</sup>			
			Day0 <sup>b</sup>	Day+3	Day+6	Day+10
Control	-	7	100.0	101.2	118.9	120.1
CRHS	×0.05	7	101.9	101.5	98.4	102.1
	×0.1	7	101.7	95.4	94.2	95.8
	×0.5	7	101.9	95.2	88.6*	94.4
Ibuprofen	200mg/kg	7	94.6	90.3	88.9	91.2

a : increase percent indicates mean value.

b : samples were administrated 18 days after Freund's complete adjuvant injection.

\* :  $p < 0.05$  as compared to control.

### 3) II형 PLA2의 활성화에 미치는 영향

×0.01 농도에서는 4.9%, ×0.05 농도에서는 11.4%, ×0.1 농도에서는 13.2%, 그리고 ×0.5 농도에서는 23.8%의 II형 PLA<sub>2</sub> 활성화 억제효과를 보였다(Fig. 4). 따라서 본 실험의 결과, 위령선약침액은 *Crotalus atrox* 유래의 II형 PLA<sub>2</sub>에 대해서 보다 *porcine pancreas* 유래의 I형 PLA<sub>2</sub>에 대한 활성화 억제 효능이 농도의존적으로 강함을 알 수 있었다(Fig. 4).

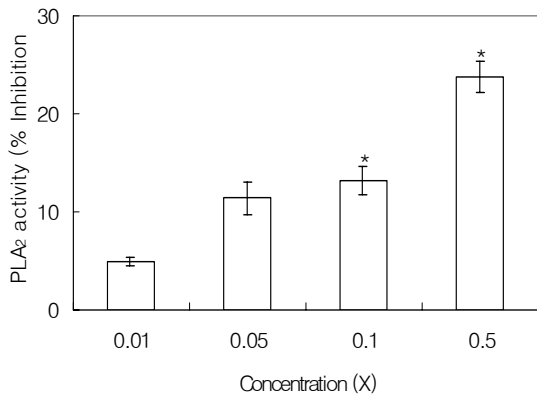


Fig. 4. Effect of CRHS on type II phospholipase A<sub>2</sub> activity

Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n=3).

\* : p<0.05 as compared to control.

### 4. Cyclooxygenase-2 활성화에 미치는 영향

위령선 약침액을 각 농도별로 동시첨가로 인해 COX-2

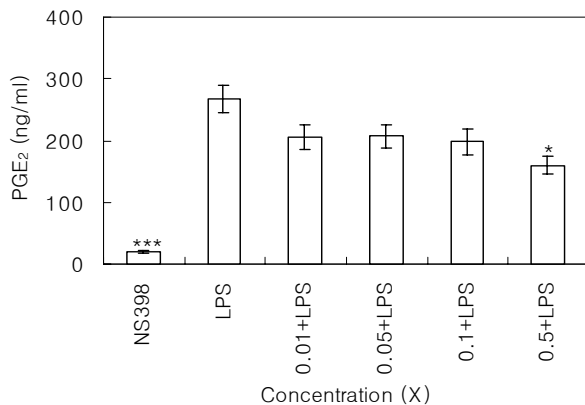


Fig. 5. Effect of CRHS on COX-2 activity from Raw 264.7 cell

Experimental details are described in Material and Methods. LPS, lipopolysaccharide. Values represent mean±SD (n=3).

\* : p<0.05. \*\*\* : p<0.005.

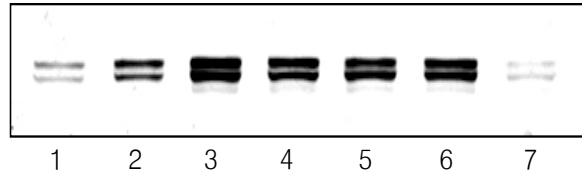


Fig. 6. Effect of CRHS on expression of cyclooxygenase-2

Experimental details are described in material and methods. The numbers means experimental condition respectively (1; control, 2; 5µM NS398, 3; 100ng/ml LPS, 4; 0.01×CRHS + 100ng/ml LPS, 5; 0.05×CRHS + 100ng/ml LPS, 6; 0.1×CRHS + 100ng/ml LPS, 7; 0.5×CRHS + 100ng/ml LPS) as compared to control.

의 활성화에 유의성 있는 저해효과가 나타났으며, 특히 0.5×의 농도에서는 LPS를 단독처리에서 보다 40.3%의 COX-2에 의한 PGE<sub>2</sub>의 감소현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

또한 이러한 현상은 western blot 분석에 의한 COX-2 단백질표현에서도 위령선 약침액 ×0.5의 농도에서 저해현상이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6).

## IV. 고찰

류머티스성 관절염은 여러 器官을 침범하는 가장 흔한 만성적인 염증성 질환의 하나로, 대표적인 자가면역성 질환으로 생각되고 있다. 이는 다양한 전신증상이 나타나기도 하나, 대칭적으로 말초관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염이 특징적으로 연부조직, 특히 관절이나 腱의 활액막에 미세균성 만성 염증반응이 장기간 나타나면서 관절통이나 종창이 악화회전을 반복하는 것을 특징으로 하며, 병이 진행됨에 따라 전신적으로 쇠약해지면 상당한 예에서는 관절외의 증상, 즉 순환기계·위장관계·신경계 혹은 안이비인후과 영역에 관절증상이 나타날 수도 있다<sup>1)</sup>.

류머티스성 관절염의 초기 병변으로 미세혈관 손상과 활막세포의 수적 증가가 나타나는데, 그 후 활막세포의 증식과 더불어 단핵구세포가 혈관주변에 침착하게 되며 과정이 진행됨에 따라 활막은 부종이 생기고 용모와 같은 돌기가 관절강 내로 돌출하게 된다. 광학 현미경으로 조사하면 활막세포의 과증식 비대외 미세혈관 손상, 혈전증, 신생혈관을 포함한 국소적·분절적 혈관변화, 부종, 단핵구 혈관주위 浸潤과 集中

같은 특징적인 모습을 볼 수 있다. 한편 류머티스성 관절염의 유병률은 인구의 0.8% 정도이며, 여성에서 남성보다 약 3배 더 많이 발생하고, 발병 연령의 80%가 35세에서 50세에 분포한다<sup>21)</sup>.

류머티스성 관절염의 발병 원인은 불확실하나 발병 시 관절강 활액 내의 type II collagen 역가 증가<sup>21)</sup>, proinflammatory cytokine인 Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )의 증가<sup>23)</sup>, 염증성 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 활성화와 염증효소 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 증가<sup>23)</sup>, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 증가<sup>24)</sup>, proteoglycan의 감소<sup>25)</sup> 등이 일어나는 기전은 잘 알려져 있다. 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류머티스성 관절염의 발병 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 그래서 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬, 질환 변형 약제(disease modifying antirheumatic drug : DMARD), 항TNF- $\alpha$ 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다<sup>26)</sup>. 이러한 비스테로이드성 소염제를 경구투여하는 경우 위장관, 신장, 간, 혈액, 중추신경계 등의 전신적인 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 이러한 부작용을 적게 하고 소염작용을 극대화하려는 노력이 계속되고 있는 실정이다<sup>27)</sup>. 이에 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 류머티스성 관절염은 관절이 부어서 통증이 오고 결국 관절이 변형되어 움직일 수 없게 되며, 특히 팔다리의 관절은 진행되는 속도도 빠르고 나타나는 방식도 강하다. 그러므로 이러한 관절염은 한의학적으로 볼 때 痺證과 연관시킬 수 있다<sup>28)</sup>.

《金匱要略·中風歷節篇》, 그리고 《巢氏諸病原候論》에서의 風濕痺候, 風濕候, 風痺候, 歷節風候 등은 모두 痺證의 범주에 속하며, 이후 각 醫家의 저서에서도 논하고 있다. 痺證의 원인은 內因으로는 氣血不足과 營衛不固이고, 外因으로는 기후조건, 생활환경 등과 관련되어 風·寒·濕의 邪氣가 틈을 타서 침입한 소치로 보고 있다<sup>29)</sup>.

치료 원칙은 각각의 원인에 따라 달라지는데, 外因으로는 體虛한 상태에서 起居失常 등으로 風·寒·濕, 熱邪가 皮膚, 血脈, 肌肉, 筋骨, 經, 絡 등에 入하여 發病하고, 內因의 境遇는 七情, 飲食不節, 虛勞, 房

勞 등으로 인해 병이 오랫동안 제거되지 않고 다시 邪氣가 들어와 臟腑의 허실을 초래하여 內寒, 內風, 內濕, 內熱, 內燥, 氣虛, 血虛, 陰虛, 陽虛, 痰飲, 瘀血 등의 병리현상이 발생<sup>30)</sup>되는 것으로 인식하여, 臟腑의 허실을 조절하고 濕, 痰飲, 瘀血 등을 제거하기 위해 活血化瘀, 祛痰散結, 消風散寒除濕과 동시에 補益肝腎, 補氣益血하는 치법이 사용된다<sup>31)</sup>.

약침요법이란 기존의 침법과 한약의 효능을 결합하여 발전시킨 신침요법의 일종으로, 한약제제를 경혈의 자극수단으로 사용하는 것을 말한다. 즉 약침요법이란 순수 한약제에서 정제, 추출하여 침을 놓을 자리에 극소량의 약물을 주입함으로써 침의 작용과 한약의 작용을 병행하여 치료를 보다 극대화 시키기 위한 침요법을 말한다<sup>32)</sup>.

威靈仙은 毛茛科(미나리아재비과)에 속하는 다년생 낙엽성 蔓莖植物인 으아리 *Clematis manshurica* RUPR.와 威靈仙 *C. chinensis* O<sub>SBECK</sub> 및 棉團鐵線蓮 *C. hexapetala* P<sub>ALL</sub>의 根과 根莖을 건조한 것으로, 性味는 溫 無毒 辛鹹하고, 膀胱經으로 歸經하고 祛風除濕, 通絡止痛의 효능이 있어 風濕痺痛, 肢體麻木, 筋脈拘攣, 屈伸不利, 骨硬咽喉 등에 이용되고 있다<sup>13)</sup>.

威靈仙의 효능에 관하여 백굴채, 모과와의 혼합약 침액이 관절염 유발 백서의 염증에 대한 효과<sup>14)</sup>, 콜라겐으로 유발된 골관절염에서 nNOS, NOS 발현 증가<sup>15)</sup>, 威靈仙 수침액이 급성 통풍성 관절염에 효과<sup>16)</sup> 등이 보고된 바 있으나 Type II collagen, Freund's complete adjuvant, LPS 및 Phospholipase A2로 유도된 류마티스 관절염에 대한 동물실험 연구는 없었다.

이에 저자는 위령선(*Clematidis radix*)을 사용하여 약침액을 제조하고, mouse를 대상으로 type II collagen, Freund's complete adjuvant, lipopolysaccharide(LPS) 및 phospholipase A2 유도 류마티스 관절염을 유발한 후 약침액(*Clematidis radix* herbal-acupuncture solution, CRHS)을 투여하여 관절염에 미치는 영향과 기전을 규명하고자 실험을 시행하였다.

일반적으로 관절염 및 만성 염증성 통증 질환의 연구를 위한 동물실험 모델로서 adjuvant 유발 관절염, collagen 유발 관절염, aviridine 유발 관절염, pristane 유발 관절염 및 oil 유발 관절염 등 많은 방법이 알려져 있다. 그 중 한 종류인 type II collagen-induced arthritis(CIA)는 류마티스 관절염의 대표적 실험동물 모델로서 Trentham 등<sup>33)</sup>에 의해 1977년에 처음 발표된 이후로, 인체에서 자가면역과 관련된 연구를 위해 널리 사용되어 지고 있다. Synovial tissue에 침착되



어 있는 여러 세포들은 순환혈에 존재하는 면역세포와는 다른 활성화 상태를 유지하고 있는데 이러한 상태는 synovial tissue에 존재하는 다양한 세포들에서 분비되는 여러 cytokines에 의한 것이다. 본 실험에서도 양성·음성대조군 및 세 종류의 농도( $\times 0.05$ ,  $\times 0.1$ ,  $\times 0.5$ )로 구분된 위령선 약침액 투여군을 비교해본 결과 음성대조군에서 관절염 지수가 최고로 높았으며, 이에 반해  $\times 0.5$  농도의 CRHS투여군에서 양성대조군 다음으로 적은 관절염 지수를 보였다.

두 번째 만성 염증 유발물질로서 Freund's complete Adjuvant를 사용하였는데, 이 경우에는 peptidoglycan에 의해 다발성 관절염이 유발되는데 인간의 류머티스성 관절염과의 유사성으로 인하여 류머티스성 관절염의 실험 모델로 광범위하게 이용되고 있으며, 만성적인 관절염의 항염증 작용과 만성 염증성 통증에서의 유효수용에 관한 연구에 널리 이용되고 있다<sup>34,35</sup>. 본 실험에서 음성대조군, CRHS투여군( $\times 0.05$ ,  $\times 0.1$ ,  $\times 0.5$ ), 양성대조군(ibuprofen)으로 설정하여 mouse의 족부종 정도를 측정해본 결과, 음성대조군에서는 측정일마다 최고치로 나왔으며,  $\times 0.5$  CRHS투여군에서는 6일째와 10일째 각각 25.4% 및 21.4%의 억제효과가 나타났으며, 특히 6일째에는 양성대조군의 족부종 수치보다 낮게 관찰되었다.

또한 관절염을 비롯한 염증반응은 세포막의 인지질분해와 관련된 phospholipase (PL) A<sub>2</sub>와 COX가 관여하는 PG의 생성이 중요시되고 있다. PLA<sub>2</sub>는 세포막의 기본성분인 인지질의 2번 위치의 acyl기를 가수분해해서 유리지방산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이다<sup>36</sup>. 분자량 및 Ca<sup>2+</sup>요구성에 따라 분비형(secretory), 세포질형(cytosolic), Ca<sup>2+</sup>비의존적 및 PAF (platelet activating factor)와 특이적으로 결합하는 PLA<sub>2</sub> 등 다양하게 분류되며 본 실험에 사용한 PLA<sub>2</sub>는 세포막 인지질(phospholipid)의 구성성분인 arachidonic acid에 특이적이며 관절염과 밀접한 관계가 있다. 본 실험에서는 porcine pancreas 유래의 I형 및 crotalus atrox 유래 II형의 2가지 형태로 PLA<sub>2</sub>의 활성을 실험하였고 두 물질 모두  $\times 0.5$  CRHS투여군에서 최고의 PLA<sub>2</sub> 활성억제를 보였으며, porcine pancreas 유래의 I형에서 보다 활성억제 효능이 강함을 알 수 있었다.

LPS는 동물에 각종 실험적 자가면역병을 유발하는 물질로서<sup>37</sup>, 염증반응 매개물질인 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유발시키며, PGE<sub>2</sub>의 생성도 증가시켜서, 관절강 내에 주사할 경우 일과성의 급성 관절염을 유발시킬 수 있다. cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase)

는 prostanoids(prostaglandins, prostacycline과 thromboxanes) 합성을 위한 주요 효소이다<sup>38</sup>. 이 중 COX-2는 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는데, 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성 염증질환, 즉 류머티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다<sup>39-40</sup>.

PGE<sub>2</sub>는 과골세포를 활성화시키는 생리적 골흡수 유도체로서 염증 반응 시 많은 염증세포들로부터 분비되어 혈관확장, 발열 및 통증을 유발하는 중요 인자로 류마티스 관절염에서 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>41</sup>. 특히 adjuvant 유발 관절염에서 내인성 PGE<sub>2</sub>는 IL-6같은 cytokine의 생산을 자극한다<sup>42</sup>. 실험에서는 LPS가 유도하는 COX-2 활성화에 미치는 영향을 PGE<sub>2</sub>의 생성량을 통해 확인해보았으며, 역시나 음성대조군에서 가장 높은 수치가 나왔으며,  $\times 0.5$ 의 농도에서 40.3%의 COX-2에 의한 PGE<sub>2</sub>의 감소현상을 관찰할 수 있었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 위령선 약침액은 mouse에서 collagen, adjuvant, LPS 및 PLA<sub>2</sub> 유도 류머티스성 관절염의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, 작용기전 중 COX-2 및 PGA<sub>2</sub>의 활성을 억제시키는 것으로 보아 항염증 및 진통에 효능이 있어 충분히 류마티스 관절염을 비롯한 염증반응의 치료에 널리 응용될 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 위령선약침액은 저용량에서 효능이 있기 때문에 약침액( $\times 1$ )으로 사용 시 인체에 미치는 독성 및 안전성에 대해 고려할 필요가 있다고 생각되며, 앞으로 IL-1 $\beta$ , IL-4, tumor necrosis factor- $\beta$  등 염증성 cytokine에 대한 국소 관절 및 혈액에서의 변화 등 더 많은 연구가 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

위령선약침액을 조제하여 mouse를 대상으로 하여 collagen 및 Freund's complete adjuvant 유도 류머티스성 관절염에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Mouse의 collagen 유도 류머티스성 관절염에서

위령선약침 처치는 6~8주째에는 유의성 있게 관절염지수의 감소를 나타내었다.

2. Freund's complete adjuvant 유발 관절염에서 위령선약침 처치는  $\times 0.1$ 의 농도에서 6일째와 10일째 되는 날에 20.8% 및 20.2%의 억제효과가 나타났으며, 또한  $\times 0.5$ 의 농도에서는 6일째와 10일째 되는 날에 25.4% 및 21.4%의 억제효과를 각각 나타내었다.
3. 위령선약침이 *porcine pancreas* 유래의 I형 및 *Crotalus atrox* 유래의 II형 phospholipase (PL) A<sub>2</sub> 활성에 미치는 영향을 검토한 결과, 농도의 존적으로 I형과 II형 PLA<sub>2</sub> 활성 억제효과를 보였다. II형 PLA<sub>2</sub>에 대해서 보다 I형 PLA<sub>2</sub>에 대한 억제활성 효능이 더 강하게 나타났다.
4. Western blot 및 prostaglandin E<sub>2</sub> 측정 결과 위령선약침액은 cyclooxygenase-2의 활성을 저해시키는 것으로 나타났다.

## VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 대한정형외과학회. 1997 :123-31, 155-75, 175-89.
2. 이문호 외. 내과학 下. 서울 : 학림사. 1986 : 1695-704.
3. 전재범, 김동욱, 김태환, 김승영, 김평남, 정성수, 이인홍, 배상철, 유대현, 김순길, 김성운. 류마티스 관절염 환자의 활막세포와 T세포의 유착에서 ICAM-1의 역할. 대한류마티스학회지. 1995 ; 2(2) : 119-25.
4. 박재홍, 박형배, 정성수. 류마티스 관절염 병인의 새로운 모형. 대한류마티스학회지 2002 : 9(2) : 85-9.
5. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A<sub>2</sub>-a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. 12 : Immunology Today. 1991 ; 12(5) : 143-6.
6. Hara S., Kudo I, Chang HW, Matsuta K, Miyamoto T and Inoue K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A<sub>2</sub> from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. J Biochem. 1989 ; 105(3) : 395-9.
7. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2003 ; 21(4) : 177-96.
8. 全國韓醫科大學 再活醫學科教室. 東醫再活醫學科學. 서울 : 서원당. 1995 : 95-6, 111-6.
9. 최유행, 김갑성, 이승덕. 계지약침자극이 mouse의 LPS유발 관절염증 세포성면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 100-12.
10. 장준혁, 김경호, 김갑성. 황백 및 위령선 약침액이 lipopolysaccharide유발 관절염의 IL-1 발현억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 : 16(1) : 511-31.
11. 이연경, 이병렬. 목방기약침의 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(4) : 125-42.
12. 이승덕, 김갑성. 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 287-315.
13. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 261-2.
14. 장승욱, 김연섭. 白屈菜·木果·威靈仙 혼합 약침액이 관절염 白鼠의 염증과 肝에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(2) : 484-9.
15. 양국정, 김순중, 서일복, 박세근, 김정선, 서정철, 최선미, 이혜정, 김이화. 위령선 약침이 콜라겐으로 유도된 골관절염 모델에서 흰쥐의 PAG 영역에서 NOS 발현에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2005 ; 22(4) : 109-116.
16. 장현석. 威靈仙水鍼이 痛風誘發 흰쥐의 病理的 所見에 미치는 影響. 경산대학교 석사학위논문. 1994.
17. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
18. Durie FH, Fave RA and Noelle RJ. Short analytical review, collagen induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. Clin Immunol Ommunopathol. 1994 ; 73(1) : 11-8.
19. Claude VW, Lois AL and Marvin DS. Comparative bioassay of drugs in adjuvant-induced arthritis in rats flufenamic acid, mefenamic acid and phenylbutazone. Arthritis and Rheumatism. 1969 ; 12 : 472, 1969.
20. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocytes phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum.

- 2001 ; 44(6) : 1273-80.
21. E Braunwald, A Fauci, D Kasper, S Hauser, D Longo, J Jameson. 해리슨 내과학. 서울 : MIP. 2006 : 2148-50
  22. Leo AB, Joosten Monique MA, Helsen Fons AJ, van de Loo Wim B, van de Bern. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in dba/a mice. *Arthritis Rheum.* 1996 ; 39(5) : 797-809.
  23. Leech M, Metz CN, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis. evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 1999 ; 42(8) : 1601-8.
  24. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, et al. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4. Suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2. *Medical Science.* 1989 ; 86(10) : 3803-7.
  25. Mc Donnell J, Hoerner LA, Lark MW et al. Recombinant human interleukin-1 $\beta$  induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism.* 1992 ; 35(7) : 799-805.
  26. 송정수. 류마티스관절염의 완치를 향하여. 대한내과학회지. 2005 ; 69(6) : 581-89.
  27. 김예리, 유태석, 박훈기, 김태환, 전재범, 정성수, 유대현, 배상철. 류마티스 관절염환자에서 대체의학의 이용실태 및 유용성. 대한류마티스학회지 2002 ; 9(3) : 173-83.
  28. 김무진, 윤종화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 슬관절염의 침구치료에 관한 문헌고찰. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 191-201.
  29. 황우준. 류마티스성 관절염에 대한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 1995 ; 12(1) : 281-90.
  30. 金起瑩. 類風濕性關節炎의 病因·病機 및 治法에 대한 文獻的 考察. 한방재활의학회지. 1998 ; 8(2) : 223.
  31. 王顯明. 中醫內科辨證學. 北京 : 人民衛生出版社. 1984 : 397-401.
  32. 대한약침학회. 약침요법총론. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 318.
  33. Trentham DE et al. Autoimmunity to type II collagen. an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 1977 ; 146(3) : 857-68.
  34. Colpaert FC. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain.* 1987 Feb ; 28(2) : 201-22.
  35. Kwon YB, Kang MS, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice : role of alpha(2) adrenoceptors. *Neurosci Lett.* 2001 ; 208(2) : 133-7.
  36. 남경수. Phospholipase A2에 의한 정보전달경로. 분자생물학뉴스. 1997 ; 9 : 19-27.
  37. 오찬호. 신면역학 입문. 서울 : 지구문화사. 1995 : 118-23.
  38. DeWitt, DL. Prostaglandin endoperoxidase: Regulation of enzyme expression. *Biochem Biophys Acta.* 1991 ; 1983(2) : 121-34.
  39. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 1993 ; 17(2) : 38-40.
  40. HJ Rothkotter, R Pabst and M Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno immunopath.* 1999 ; 72(1-2) : 157-65.
  41. 김형룡, 강장숙. Cyclic AMP analog와 PGE2가 마우스 조골세포의 활성화에 미치는 영향. *The Journal of Wonkwang Biomaterial Implant Research Institute.* 1996 ; 5(2) : 63-76.
  42. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 1996 ; 184(3) : 883-91.