대한침구의학회지 제30권 제4호 (2013년 9월) : 95-105
The Acupuncture Vol. 30 No. 4 September 2013 : 95-105
pISSN 1229-1137 eISSN 2287-7797
http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2013026

Original Article

薑黃약침이 CFA로 유발된 류마티스성 관절염에 미치는 영향

이욱재[1], 이동근[1], 이주희[1], 이정훈[1], 이상현[1], 박근희[2], 신정철[1,*]

[1]동신대학교 한의과대학 침구의학교실
[2]동신대학교 한의과대학 사상체질의학교실

[Abstract]

Effects of *Curcuma longa* L$_{INNE}$ Pharmacopuncture at ST$_{36}$ on Adjuvant Induced Arthritis in Rats

Ook Jae Lee[1], Dong Geun Lee[1], Ju Hee Lee[1], Jung Hun Lee[1], Sang Hyun Lee[1], Geun Hee Park[2] and Jeong Cheol Shin[1,*]

[1]Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University
[2]Department of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives : The objective of this study was to investigate the effects of *Curcuma longa* L$_{INNE}$ pharmacopuncture at ST$_{36}$ on Complete Freund's Adjuvant(CFA)-induced arthritis in rats.

Materials and methods : Arthritis was induced by injecting CFA subcutaneously into the left knee joint and paw, and *Curcuma longa* L$_{INNE}$ pharmacopuncture(CLL-A. 0.0343 ㎍/㎏; CLL-B. 0.171 ㎍/㎏; CLL-C. 0.343 ㎍/㎏) was injected at ST$_{36}$ each other day for 5 times beginning on day 10 after the CFA injection. Paw edema, withdrawal response, hematological, serological and histological observation were assessed.

Results : In paw edema volume all 3 groups(CLL-A, CLL-B, CLL-C) showed significant decrease compared to the CFA control group. In withdrawal response to reaction time and withdrawal response to force all 3 groups(CLL-A, CLL-B, CLL-C) showed significant increase compared to the CFA control group. In serum AST, group CLL-C showed significant decrease compared to the CFA control group. In histological observations, in all 3 groups, more normal chondrocytes were observed compared to the CFA control group and safranin O stain showed high positive reaction in the cartilage tissue close to the bone tissue.

Conclusions : The results suggest that *Curcuma longa* L$_{INNE}$ Pharmacopuncture at ST$_{36}$ has a suppressing inflammation effect on Freund's adjuvant arthritis in rats.

Key words :
Rheumatoid arthritis;
Freund's adjuvant arthritis;
Curcuma longa L$_{INNE}$ pharmacopuncture;
ST$_{36}$

Received : 2013. 08. 08.
Revised : 2013. 08. 25.
Accepted : 2013. 08. 26.
On-line : 2013. 09. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Mokpo Oriental Hospital of Dongshin University, 313, Baengnyeon-daero, Mokpo-si, Jeollanam-do, 530-822, Republic of Korea
Tel : +82-61-280-7903 E-mail : fire-sjc@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (http://www.TheAcupuncture.or.kr)
Copyright © 2013 KAMMS. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

Ⅰ. 서 론

류마티스성 관절염은 만성 전신성 염증 병변의 일환으로, 여러 가지 전신적 증세가 나타나기는 하지만 말단 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활막염이 대칭적으로 분포하는 것이 특징적이며, 그 원인으로 자가 면역이 증추역할을 한다고 알려져 있다[1,2].

한의학에서 류마티스성 관절염은 痺症, 歷節風, 鶴膝風 등의 범주에 속한다고 생각할 수 있으며[3], 그 원인은 風·寒·濕·熱의 邪氣가 인체의 正氣虛弱한 틈을 타고 경락으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 혈기운행이 저해되어 발생하는 것으로 보고 있다[4].

류마티스성 관절염의 병태 모델로서는 collagen 유발 관절염, adjuvant 유발 관절염이 주로 쓰이는데, adjuvant 유발 관절염은 1956년 Pearson[5]에 의해 고안된 실험적 질환으로, 근래 약침을 이용한 류마티스성 관절염 연구에 다수 이용되고 있다[6-10].

약침요법은 한약에서 정제 추출한 약물을 주입기로 혈위에 주입함으로써 자침과 약물의 효과를 동시에 누릴 수 있는 신침요법의 일종이다[11].

薑黃(*Curcuma longa* L$_{INNE}$)은 破血行氣, 通經止痛하는 효능이 있어 心腹痞滿脹痛, 經閉, 癥瘕, 風濕肩臂疼痛, 跌撲腫痛 등에 응용되는 약물로서[12], 항암효과[13,14], 전립선비대증에 대한 효과[15], 혈청지질 강하 효과[16], 신부전에 대한 효과[17], 췌장염 억제 효과[18], 항산화 효과[19], 항염증 효과[20] 등 다양한 효능을 연구한 보고들이 있으나 류마티스성 관절염과 관련하여 약침을 이용한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 Complete Freund's Adjuvant(CFA)로 유발된 류마티스성 관절염 모델에 足三里(ST$_{36}$)에 薑黃약침을 시행하여 족부종의 변화, 이질통에 대한 회피반응시간 및 자극 강도의 변화, 혈액 및 혈청학적 변화, 조직학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

(1) 동물

체중이 약 200~210 g의 Sprague Dawley계의 백서를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 24~26 ℃, 습도 40~60 %) 내에서 고형사료(Pellet, GMO, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안에도 물과 고형사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(2) 약물

본 실험에서 사용한 강황(*Curcuma longa* L$_{INNE}$)은 OO대학교 부속한방병원에서 구입한 것으로 국산을 사용하였다.

(3) 검액

강황 200 g을 증류수 1000 ㎖와 함께 180분간 전탕하여 추출액을 얻은 다음 원심분리기(Eppendrof, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 잔사를 버리고 상층액을 얻었다. 얻은 상층액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음, 동결건조하여 최종 시료 6 g(수득률 3 %)을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 실험 방법

(1) 투여량 및 군 분리

강황 시료 1회 투여 기준량은 0.343 ㎍/kg 기준으로 정하였으며, 기준량의 1/2배는 0.171 ㎍/kg, 기준량의 1/10배는 0.0343 ㎍/kg으로 산정하였다. 백서는 어떠한 처치도 시행하지 않은 무처치군(intact control), 관절염을 유발시킨 후 약침을 시술하지 않은 대조군(CFA control), 관절염을 유발시킨 후 강황 시료 1회 투여 기준량의 1/10배를 약침시술한 군(*Curcuma longa* L$_{INNE}$ A group ; CLL-A), 관절염을 유발시킨 후 강황 시료 1회 투여 기준량의 1/2배를 약침시술한 군(*Curcuma longa* L$_{INNE}$ B group ; CLL-B), 관절염을 유발시킨 후 강황 시료 1회 투여 기준량을 약침시술한 군(*Curcuma longa* L$_{INNE}$ C group ; CLL-C)으로 각각 나누었다.

(2) CFA 관절염 유발

관절염 1차 유발은 complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, MD, USA, CFA)로 백서의 왼쪽 슬관절에 sterile hypodermic sylinge(Korea vaccine co, Korea)로 0.25 ㎖씩 투여하고, 10일 경과 후 2차 유발하였다. 2차 유발은 CFA로 백서의 왼쪽 슬관절 아래 방향으로 sterile hypodermic sylinge(Korea vaccine co, Korea)로 0.1 ㎖씩 투여하고 왼쪽 발바닥에 sterile hypodermic sylinge(Korea vaccine co, Korea)로 0.08 ㎖씩 투여하였다.

(3) 족삼리 취혈 및 약침 시술

족삼리(ST_{36}) 취혈은 경골조면 하부에서 인체에 상응하는 부위로 취하였으며, 족삼리 부위의 약침 시술은 관절염 유발 후 10일째부터에 시작하였으며, 2일에 각 1회씩 총 5회에 걸쳐 시행하였다. 시술은 양측에 시행하였다.

(4) 발목이하 부종 측정

Isoflurane 2.5 %와 O2로 혼합된 가스 마취상태 하에서 digital plethymometer(LE7500, Panlab, Spain)를 이용해 백서의 발목 이하 부종을 측정하였으며, 측정은 실험 시작 전, 유발 후 10일, 12일, 14일, 16일, 18일, 20일에 각각 시행하였다.

(5) Dynamic plantar aesthesiometer 측정

수술 후 3일째부터 4일에 1회씩 dynamic plantar aesthesiomete(UGO BASILE 37450, Italy) 를 이용하여, 각각 이에 대한 철회반응(withdrawal response)을 망으로 된 cage에 옮겨 5분간 안정시킨 후 관찰하였다.

Stimulator 자극에 의한 이질통 측정 방법은 0 g에서부터 50 g 강도까지 환측 발 바닥 부위에 자극하여 발의 철회반응의 reaction time(stimulator가 발바닥에 contact하여 다시 떨어질 때까지의 시간 : second)과, force intensity(실험체가 stimulator를 피한 순간의 힘 : gram)를 얻었다.

(6) 혈액 및 혈청학적 검사

채혈에 의하여 얻어진 혈액 중 약 100 ㎕를 EDTA-bottle에 넣은 후 곧바로 multispecies hematology analyser(950, Hemavet, USA)에 주입하여 leukocytes, erythrocytes, thrombocytes를 측정하였다. 나머지 혈액은 고속원심분리기(Centricon T-42K, Italy)에서 3,500 rpm으로 20분간 시행하여 혈청을 분리하였으며, 혈청 분석은 AST와 ALT를 측정하였다.

(7) 조직학적 검사

① 조직 제작

우측 슬관절을 적출하여 Bouin 용액에 24시간 이상 고정하였으며, 5% 질산(nitric acid) 용액에서 3일 동안 매일 질산액을 교환하면서 탈회(decalcification)를 실시하였다. 파라핀 블록의 제작을 위해 채취한 조직은 tissue processor (Tissue-Tex II, Japan)를 사용하여 조직탈수 과정을 거치게 하였다.

② Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색

조직은 deparaffin을 거친 후 hematoxylin(Muto, Japan)과 Eosin(Muto, Japan)으로 염색한 후 물로 세척하고 dehydration 과정을 거쳐 광학 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

③ Safranin O - fast 염색

조직은 deparaffin을 거친 후 hematoxylin(Muto, Japan)용액에 10분간 반응시킨 후 10분간 흐르는 물에 세척하였고, 0.001 % fast green(Sigma, USA)용액에 5분 동안 염색하고, 다시 1 % 아세트산 용액에 10초간 반응시킨 후 0.1 % safranin O(Sigma, USA)용액에 5분간 염색하였다. 그 다음 10분간 충분히 세척하여 dehydration 과정을 거쳐 광학 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

3. 통계 처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS 14.0 ver. for Windows를 사용하였다. 관절염 유발 후 용량별 투여에 따른 각 군간의 통계학적 분석은 one-way ANOVA test를 시행하였고 사후검정은 LSD test로 분석하였다. 실험의 분석에서 유의수준은 $p<0.05$로 설정하여 검정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 족부종 변화에 미치는 영향

족삼리 혈위에 대한 강황 약침이 족부종에 미치는 영향을 관찰한 결과, CFA 대조군은 유발 전인 0일째에는 1.90±0.05 ㎖를, 유발 후 10일째에는 3.43±0.23 ㎖를, 유발 후 12일째에는 3.40±0.14 ㎖를, 유발 후 14일째에는 3.39±0.15 ㎖를, 유발 후 16일째에는 3.64±0.19 ㎖를, 유발 후 18일째에는 3.56±0.19 ㎖를, 유발 후 20일째에는 3.67±0.20 ㎖로 각각 나타났다.

대조군에 비하여 관절염 유발 후 16일째인 3회 치료 시 CLL-C군이 유의한 감소를 나타내었고, 18일째인 4회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 감소를 나타났고, 20일째인 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 감소가 나타났다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Changes on the Paw Edema Volume after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats

Group	Days(times)	0	10	12 (1st)	14 (2nd)	16 (3rd)	18 (4th)	20 (5th)
Controls	Intact (n=5)	1.74±0.06	1.89±0.03	1.83±0.05	1.92±0.06	1.91±0.04	1.97±0.05	2.04±0.04
	CFA (n=5)	1.90±0.05	3.43±0.23$^{\#\#}$	3.40±0.14$^{\#\#}$	3.39±0.15$^{\#\#}$	3.64±0.19$^{\#\#}$	3.56±0.19$^{\#\#}$	3.67±0.20$^{\#\#}$
Acupuncture	CLL-A(n=5)	1.89±0.04	3.78±0.22	3.23±0.14	3.28±0.12	3.16±0.15	2.95±0.18*	2.83±0.12**
	CLL-B (n=5)	1.89±0.03	3.97±0.27	3.46±0.16	3.31±0.14	3.16±0.10	2.90±0.14*	2.89±0.09*
	CLL-C (n=5)	2.04±0.05	3.41±0.19	3.14±0.18	3.03±0.17	3.07±0.13*	2.69±0.07**	2.65±0.07**

Values are expressed mean±SE.
CFA : complete Freund's adjuvant. CLL-A : CLL 10 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST-36). CLL-B : CLL 50 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST-36). CLL-C : CLL 100 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST-36).
: p<0.01 compared with intact control. * : p<0.05, ** : p<0.01 compared with CFA control.

Table 2. Changes on the Withdrawal Response to Reaction Time after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats (Sec)

Group	Days(times)	0	10	12 (1st)	14 (2nd)	16 (3rd)	18 (4th)	20 (5th)
Controls	CFA(n=5)	6.0±0.5	2.8±0.6	3.3±0.5	3.0±0.6	2.7±0.4	2.3±0.4	1.7±0.2
Acupuncture	CLL-A (n=5)	5.6±0.6	2.5±0.5	3.2±0.4	4.2±0.5	3.2±0.3	3.6±0.3*	4.4±0.4**
	CLL-B (n=5)	5.2±0.3	2.7±0.6	3.1±0.5	3.7±0.4	3.8±0.2*	3.7±0.2*	4.5±0.3**
	CLL-C (n=5)	5.7±0.2	2.1±0.4	3.2±0.3	3.8±0.2	3.6±0.3	4.6±0.4**	4.2±0.6**

Values are expressed mean±SE. A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
* : p<0.05, ** : p<0.01 compared with CFA control.

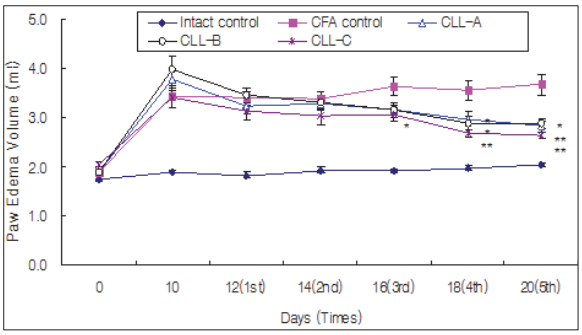

Fig. 1. Changes on the paw edema volume after CLL phamacopuncture at *Joksamri* acupoint in CFA induced arthritis rats
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
p<0.01 compared with intact control.
* p<0.05, ** p<0.01 compared with CFA control.

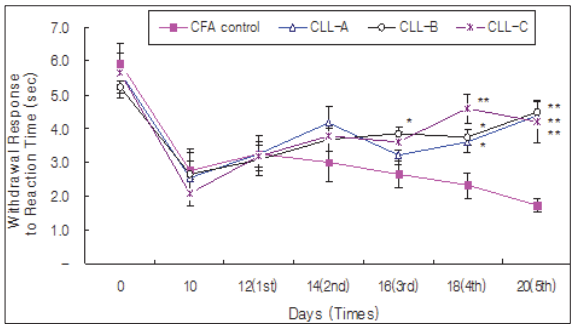

Fig. 2. Changes on the withdrawal response to reaction time after CLL phamacopuncture at *Joksamri* acupoint in CFA induced arthritis rats
Values are expressed mean±SE.
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
* : p<0.05, ** : p<0.01 compared with CFA control.

2. 이질통에 미치는 영향

(1) 반응시간

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 이질통에 미치는 영향을 반응시간으로 관찰한 결과, CFA 대조군은 유발 전인 0일째에는 6.0±0.5 sec를, 유발 후 10일째에는 2.8±0.6 sec를, 유발 후 12일째에는 3.3±0.5 sec를, 유발 후 14일째에는 3.0±0.6 sec를, 유발 후 16일째에는 2.7±0.4 sec를, 유발 후 18일째에는 2.3±0.4 sec를, 유발 후 20일째에는 1.7±0.2 sec를 각각 나타내었다.

Table 3. Changes on the Withdrawal Response to Force after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats (g)

Group	Days(times)	0	10	12 (1st)	14 (2nd)	16 (3rd)	18 (4th)	20 (5th)
Controls	CFA (n=5)	29.9±2.7	14.2±3.2	16.6±2.5	15.3±2.8	13.6±1.9	11.9±1.8	9.1±1.1
Acupuncture	CLL-A (n=5)	28.4±2.8	13.0±2.5	16.5±1.8	21.2±2.4	16.3±1.3	18.4±1.6*	22.2±2.1**
	CLL-B (n=5)	26.3±1.5	13.6±3.1	16.1±1.9	18.7±1.8	19.5±1.0*	19.0±1.2*	22.7±1.6**
	CLL-C (n=5)	28.5±1.0	10.8±2.0	16.3±1.6	19.2±1.1	18.4±1.3	23.2±2.1**	24.2±1.7**

Values are expressed mean±SE.
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compared with CFA control.

대조군에 비하여 관절염 유발 후 16일째인 3회 치료 시 CLL-B군이 유의한 증가가 나타났고, 18일째인 4회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났고, 20일째인 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다(Table 2, Fig. 2).

(2) 자극강도

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 이질통에 미치는 영향을 자극강도로 관찰한 결과, CFA 대조군은 유발전인 0일째에는 29.9±2.7 g을, 유발 후 10일째에는 14.2±3.2 g을, 유발 후 12일째에는 16.6±2.5 g을, 유발 후 14일째에는 15.3±2.8 g을, 유발 후 16일째에는 13.6±1.9 g을, 유발 후 18일째에는 11.9±1.8 g을, 유발 후 20일째에는 9.1±1.1 g으로 각각 나타났다.

대조군에 비하여 관절염 유발 후 16일째인 3회 치료 시 CLL-B군이 유의한 증가가 나타났고, 18일째인 4회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났고, 20일째인 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다(Table 3, Fig. 3).

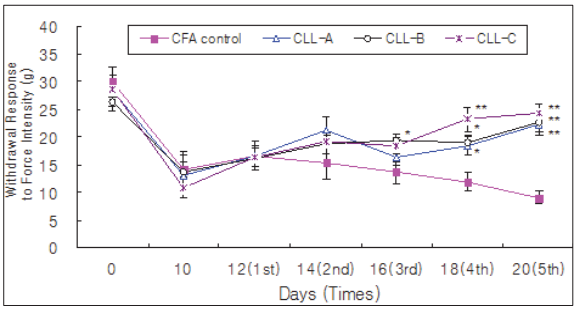

Fig. 3. Changes on the withdrawal response to force after CLL phamacopuncture at *Joksamri* acupoint in CFA induced arthritis rats
Values are expressed mean±SE. A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compared with CFA control.

3. Serum aminotransferase에 미치는 영향

(1) Aspartate aminotransferase(AST) 함량

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 AST 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, CFA 대조군은 118.0±6.1 U/l, CLL-A군은 109.8±8.0 U/l, CLL-B군은 115.4±6.1 U/l, CLL-C군은 85.8±2.6 U/l로 각각 나타났다. 대조군에 비하여 CLL-C군은 유의한 감소가 나타났다(Table 4).

Table 4. Changes on the Aspartate Aminotransferase Contents after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats

Group		Aspartate aminotransferase (U/l)
Controls	Intact (n=5)	81.6±15.0
	CFA (n=5)	118.0±6.1##
Acupuncture	CLL-A (n=5)	109.8±8.0
	CLL-B (n=5)	115.4±6.1
	CLL-C (n=5)	85.8±2.6**

Values are expressed mean±SE.
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.
: $p<0.01$ compared with intact control.
** : $p<0.01$ compared with CFA control.

(2) Alanine aminotransferase(ALT) 함량

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 ALT 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 32.3±2.5 U/l, CLL-A군은 31.6±1.4 U/l, CLL-B군은 33.8±2.6 U/l, CLL-C군은 28.0±0.6 U/l로 각각 나타났다. 대조군에 비하여 CLL-C

Table 5. Changes on the Alanine Amino-transferase Contents after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats

Group		Aspartate aminotransferase (U/l)
Controls	Intact (n=5)	27.8±4.9
	CFA (n=5)	32.3±2.5
Acupuncture	CLL-A (n=5)	31.6±1.4
	CLL-B (n=5)	33.8±2.6
	CLL-C (n=5)	28.0±0.6

Values are expressed mean±SE.
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.

군은 유의성은 인정되지 않았으나 감소한 경향이 나타났다(Table 5).

4. 혈액 Complete blood count(CBC) 함량 변화에 미치는 영향

(1) Leukocytes

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 CBC 중 leukocytes 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinphil 등 각 지표별로 CLL-B군과 CLL-C군에서 유의성은 인정되지 않았으나 감소의 경향이 나타났다(Table 6).

(2) Erythrocytes와 thrombocytes

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 CBC 중 erythrocytes와 thrombocytes 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 erythrocytes와 thrombocytes 각 지표들에 있어서 CLL-A군, CLL-B군과 CLL-C군은 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 7).

5. 조직학적 소견

(1) Hematoxylin & eosin(H&E) 염색

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 조직학적 소견에 미치는 영향을 hematoxylin & eosin 염색을 한 후 관찰한 결과, 정상군의 관절연골에서는 연골세포(chondrocytes)가 전체적으로 고르게 관찰되었다(Fig. 4A). 대조군의 연골조직에서는 대부분의 연골세포의 핵들이 손상되어 매우 응축되어 있었으며, 소수의 정상적인 연골세포가 뼈 조직과 접한 연골세포에서 관찰되었다(Fig. 4B). CLL-A군에서는 많은

Table 6. Changes on the Blood WBC Contents after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats

Group		WBC(K/uL)	Neutrophil(K/uL)	Lymphocyte(K/uL)	Monocyte(K/uL)	Eosinphil(K/uL)
Controls	Intact (n=5)	5.1±0.8	1.4±0.2	3.7±0.56	0.28±0.050	0.018±0.004
	CFA (n=5)	7.28±0.87	2.16±0.18	4.55±0.74	0.53±0.14	0.04±0.01
Acupuncture	CLL-A (n=5)	6.56±1.01	2.06±0.29	3.95±0.75	0.52±0.08	0.02±0.004
	CLL-B (n=5)	5.65±0.72	1.90±0.20	3.38±0.77	0.36±0.06	0.02±0.01
	CLL-C (n=5)	5.73±0.32	1.78±0.23	3.49±0.19	0.45±0.05	0.01±0.003

Values are expressed mean±SE.
A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.

Table 7. Changes on the Blood RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC and PLT Contents after CLL Phamacopuncture at *Joksamri* Acupoint in CFA Induced Arthritis Rats

Group		RBC(K/uL)	HGB(g/dL)	HCT(%)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)	PLT(K/uL)
Controls	Intact (n=5)	7.7±0.2	14.9±0.3	49.7±0.8	64.8±0.6	19.4±0.4	30.3±0.1	852.4±37.1
	CFA (n=5)	7.9±0.1	14.9±0.1	51.1±1.3	62.6±0.4	17.1±0.4	27.3±0.6	1,059.2±272.3
Acupuncture	CLL-A (n=5)	8.0±0.2	14.7±0.3	50.4±1.2	59.3±0.4	16.8±0.4	28.3±0.7	1,211.6±225.2
	CLL-B (n=5)	8.1±0.2	15.0±0.3	52.1±0.6	62.8±2.0	16.9±2.0	30.1±0.6	903.8±69.3
	CLL-C (n=5)	8.1±0.1	15.2±0.2	51.7±1.3	63.5±0.4	18.7±0.4	29.4±0.3	996.0±47.2

Values are expressed mean±SE. A description of controls and acupuncture groups refer to Table 1.

 http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2013026

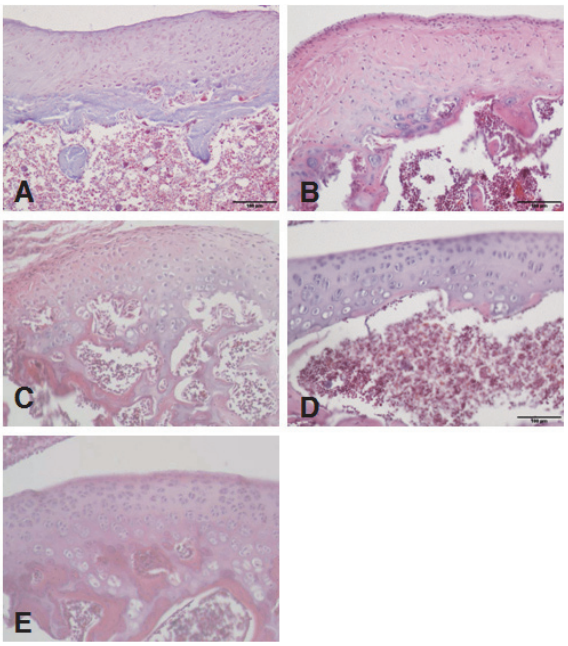

Fig. 4. Changes on the histopathological change (HE stain) of knee joint after CLL phamaco-puncture at *Joksamri* acupoint in CFA induced arthritis rats
A : intact control.
B : CFA control.
C : CLL-A, CLL 10 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
D : CLL-B, CLL 50 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
E : CLL-C, CLL 100 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
HE-stain, scale bars = 100 ㎛.

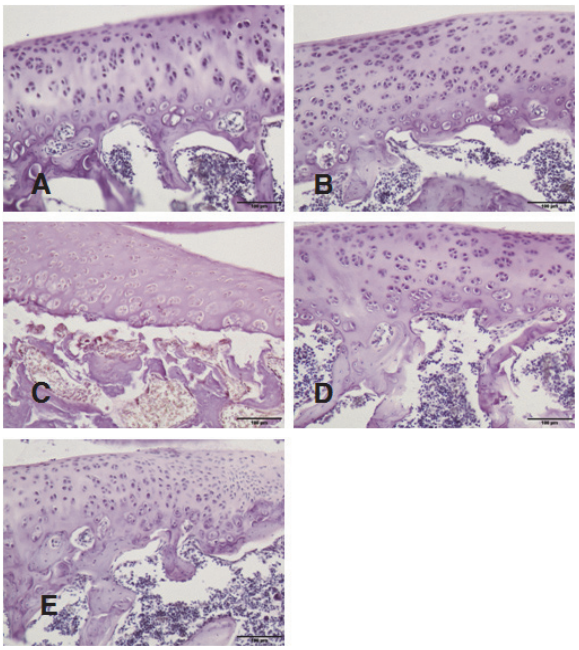

Fig. 5. Changes on the histopathological change (safranin O-fast stain) of knee joint after CLL pham-acopuncture at *Joksamri* acupoint in CFA induced arthritis rats
A : intact control.
B : CFA control.
C : CLL-A, CLL 10 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
D : CLL-B, CLL 50 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
E : CLL-C, CLL 100 % phamacopuncture at *Joksamri*(ST_{36}).
Safranin O-fast stain, scale bars = 100 ㎛.

연골세포들이 손상되어 있었으나 뼈 조직과 접한 부위에서는 다수의 정상적인 연골세포가 관찰되었고, CLL-B군과 CLL-C군에서는 연골조직을 구성하는 대부분의 세포에서 손상소견이 관찰되지 않았으며, 특히 CLL-C군의 연골세포는 뚜렷한 연골세포 방을 구성하고 있었다(Fig. 4C, D, E).

(2) Safranin O-fast 염색

족삼리 혈위에 대한 강황약침이 조직학적 소견에 미치는 영향을 safranin O-fast 염색으로 관찰한 결과, 정상군의 관절연골 조직에서는 safranin O에 대한 염색성이 뼈조직과 접한 곳에서 강한 양성반응을 보였다(Fig. 5A). 대조군에서는 연골조직에서는 safranin O에 대한 염색성이 매우 낮았으며, 뼈 조직에서 다소 높게 나타났다(Fig. 5B). CLL-A군에서는 뼈 조직과 접한 연골조직에서 safranin O에 대한 양성반응을 보여주었다. CLL-B군에서도 뼈 조직과 인접한 곳의 연골조직에서 safranin O에 대한 양성반응이 나타났으며, CLL-C군에서는 보다 넓은 영역에서 양성반응이 나타났다(Fig. 5C~E).

Ⅳ. 고 찰

류마티스성 관절염은 현재까지 확실한 원인이 알려져 있지는 않지만, 전신성 · 염증성 자가 면역 질환으로 유전인자 등의 각종 인자가 그 발병에 관여하는 것으로 알려져 있는 질환이다. 류마티스성 관절염은 3가지 단계를 거쳐 발병하는데, 첫 번째 단계는 활막염이 일어나는 단계로 관절에 통증, 뻣뻣함, 열감과 부종 등이 일어난다. 두 번째 단계는 판누스(pannus)라는 침윤성 조직이 형성되고 이 조직이 점차 연골 및 뼈, 인대까지 침범하는 단계이다. 세 번째 단계는 관절이 파괴되어 통증이 심해지고 관절에 변형이 생기는 단계이다[3].

대략 2/3의 환자에게서 활막염이 나타날 때까지 피로, 식욕부진, 전신 쇠약, 모호한 근육골격계통 증세 등의 전구증세가 수주 내지 수개월 지속되며, 본 증상은 대칭 양상을 갖으며 몇 개의 관절 특히 손, 손목, 무릎, 발의 관절로부터 점차적으로 나타나 동통, 부종, 관절강직, 운동 제한 및 기능 소실 등이 나타나게 된다[3].

류마티스성 관절염은 현재 보존적 치료의 입장에서 질환의 증후의 개선에 목표를 두고 있는 실정이다. 실제 쓰이는 치료법은 증세 완화와 관절 구조의 점차적인 손상을 막기 위해 비특이적인 소염 혹은 면역과정 완화가 중심이 되고 있다[2].

한의학에서 류마티스성 관절염은 痺症, 歷節風, 鶴膝風 등의 범주에서 생각할 수 있다[3]. ≪黃帝內經 · 素問 · 痺論≫[21]에서 "風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也, 其風氣勝者爲行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲着痺"라 하여 원인에 따라 行痺, 痛痺, 着痺로 분류하였고, ≪景岳全書≫[22]에서는 "眞陰衰弱, 精血虧損, 故三氣得以勝之而爲痺"라 하였고, ≪醫學入門≫[23]에서는 "鶴膝風 三陰虛損 風邪入亦有虛火 陰血枯所以痺後多此疾"이라 하였으며, ≪外臺秘要≫[24]에서는 "白虎病者 大都風寒暑濕之毒 因虛所致 將攝失理 受此風邪經脈 凝滯血氣不行 着於骨節之間"이라 하여 대체로 虛證에 속하는 內因에 風寒濕의 外因이 겸해서 발생한다고 보았다.

본 실험에서 사용된 류마티성 관절염 병태 모델 유발물질은 CFA이다. CFA는 M. tuberculosis를 이용한 관절염 유발 물질로 관절염의 유발 및 지속성이 뛰어나고[25], 다발성 관절염 증상뿐 아니라 肝臟 등 內臟의 臟器와 림프계 등에도 장애를 일으켜 류마티스성 관절염과 매우 유사한 소견을 보이는 병태 모델이다[9].

足三里(ST_{36})는 理脾胃, 和腸消滯, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元의 穴性이 있으며[26], 鶴膝風, 痺症, 歷節風, 脚氣 등의 치료에 두루 쓰이고 있다[3].

약침요법은 경락론을 근간으로 하는 침구요법과 氣味論을 근간으로 하는 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로, 한약제를 정제, 추출하여 만든 약침액을 혈위에 주입함으로써 약물과 자침의 효과를 동시에 얻을 수 있는 치료방법이다[11].

薑黃(*Curcuma longa* L$_{INNE}$)은 생강과에 속한 다년생 숙근 본초인 薑黃*Curcuma longa* L$_{INNE}$의 根莖을 건조한 것으로 性은 溫하고, 味는 辛苦하며 肝과 脾經에 歸經한다. 性味가 辛苦하면서 溫하여, 辛溫이 상합하여 外로는 風寒을 散하고 內로는 氣血을 行하게 하며, 또한 苦溫이 상합하여 外로는 寒濕을 去하고 內로는 瘀血을 破하므로 祛瘀, 行氣, 止痛, 活絡의 효능이 있어 氣滯血瘀로 인한 諸痛에 고루 응용되며, 風濕痺痛과 關節不利, 肩臂痠痛 등 證에도 상용되는 약재이다[12]. 薑黃은 항염증 효과가 보고되고 있으며[20], 風寒濕의 邪氣를 去하고 破血行氣, 通經止痛의 효능이 있어 류마티성 관절염 치료에 유효하리라 생각되어 본 실험에서 약침액의 형태로 응용하고자 하였다.

이에 CFA로 유발된 흰쥐에게 류마티스성 관절염에 상용되는 足三里(ST_{36})에 강황약침을 농도별로 시술하여 족부종의 변화, 이질통에 대한 회피반응시간 및 자극 강도의 변화, 혈액 및 혈청학적 변화, 조직학적 변화를 통해 류마티스성 관절염에 대한 강황약침의 효과를 실험적으로 관찰하였다.

부종이란 세포 간이나 조직 간의 체강에 체액 즉, 염증성 부종액이 과다하게 축적되는 것을 말한다. 부종은 혈관에서의 투과성이 증가함으로써 나타나는데, 염증이 심하면 삼출액이 증가하여 부종이 심해진다. 따라서 부종을 관찰하여 염증의 정도 및 진행과정을 간접적으로 파악해 볼 수 있다[8].

본 실험에서는 CFA 대조군과 비교하여 3회 치료 시 CLL-C군이 유의한 감소가 나타났고, 4회와 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 감소가 나타났다. 이 결과를 토대로 살펴보면 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두에서 유의한 부종 감소가 관찰되었으므로 최소 유효농도는 강황약침을 투여 기준량의 1/10배 투여한 CLL-A군이라 생각할 수 있겠다. 효과적인 면에서는 강황약침의 투여 기준량을 투여한 CLL-C군이 3회 치료 후 유의한 감소를 보여 가장 빠른 치료 효과가 나타났으며 5회 치료 후 결과에서도 가장 좋은 효과가 나타났다.

CFA로 유발된 관절염에서는 부종과 함께 이질통(allodynia)이 나타나는데, 이질통(allodynia)이란 정상적으로 통증을 유발하지 않는 자극에 대해 민감하게 반응하여 통증을 유발하는 것을 말한다. 이는 순환중인 백혈구, 혈소판, 혈관 내피 세포, 조직 내의 면역세포, 감각신경 및 교감신경섬유로부터 방출되는 염증매개물에 의해 역치가 낮아져 발생되는 것으로 생각된다[27].

본 실험에서는 dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 물리적으로 이질통을 발생시킨 후 회피반응을 관찰한 결과 회피반응의 반응시간의 변화에 있어서 CFA 대조군에 비하여 3회 치료시 CLL-B군이 유의한 증가가 나타났고, 4회와 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다. 회피반응의 자극강도의 변화에 있어서는 CFA 대조군에 비하여 유발후 3회 치료 시 CLL-B군이 유의한 증가가 나타났고, 4회와 5회 치료 시 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다. 이 결과를 토대로 살펴보면 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두에서 유의한 이질통 억제 효과가 관찰되었으므로 최소 유효 농도는 강황약침을 투여 기준량의 1/10배 투여한 CLL-A군이라 생각할 수 있다. 치료 기간에서는 CLL-B군이 3회 치료 후 유의하게 증가하여 가장 빠른 효과를 보였다. 5회의 치료가 끝난 후 결과로 회피반응의 반응시간의 변화에서는 CLL-B군에서 가장 높은 증가를 보였고, 회피반응의 자극강도의 변화에서는 CLL-C군이 가

장 높은 증가를 보였다.

혈청 AST는 거의 모든 세포의 cytoplasm과 mitochondria에서 발견되며, 주로 간, 심장, 골격근, 신장, 췌장, 적혈구에 분포하여 이들 세포가 손상을 받으면 세포 내의 효소가 혈청 내로 유출되어서 증가하며, 간장 특이성은 비교적 낮은 효소이다. 혈청 ALT는 AST에 비해 간에 특이적으로 간 기능의 검사, 염증성 질환 치료 효과의 관찰, 독성약품에 의한 간 장애의 평가 등에 이용된다[28,29].

본 실험의 경우 CFA 대조군에 비해서 AST의 경우 CLL-C군이 유의한 감소를 나타내었고, ALT는 CFA 대조군에 비하여 CLL-C군은 유의성이 인정되지 않았으나 감소하는 경향이 나타났다. 이로보아 추후 더 많은 연구가 이루어진다면 강황약침이 임상적으로 간 기능에 유해한 영향을 주지 않으am로, 류마티스성 관절염 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

혈액학적 변화로 WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinphil는 대개 염증성 질환이나 감염성 질환에서 증가되게 된다[30]. 본 실험에서는 각 지표별로 CLL-B군과 CLL-C군에서 유의성은 인정되지 않았으나 감소의 경향을 나타내었다. 이로 보아 강황약침으로 인한 혈액학적인 변화는 크지 않았으나, 지표별로 감소하는 경향이 나타타는 것으로 보아 류마티스성 관절염으로 인한 염증의 억제에 어느 정도 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 혈액의 erythrocytes와 thrombocytes의 각 지표들은 CFA 대조군에 비해 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

류마티스성 관절염에서는 관절이 손상되고 변형이 나타나기 때문에 조직학적 소견은 의미를 갖는다. 조직학적 소견에 미치는 영향을 알아보기 위해 hematoxylin & eosin 염색을 한 후 관찰한 결과, 정상군의 관절연골에서는 연골세포(chondrocytes)들이 전체적으로 고르게 관찰되었다. 대조군의 연골조직에서는 대부분의 연골세포의 핵들이 손상되어 매우 응축되어 있었으며, 소수의 정상적인 연골세포가 뼈 조직과 접한 연골세포에서 관찰되었다. CLL-A군에서는 많은 연골세포가 손상되어 있었으나 뼈 조직과 접한 부위에서는 다수의 정상적인 연골세포가 관찰되었고, CLL-B군과 CLL-C군에서는 연골조직을 구성하는 대부분의 세포에서 손상소견이 관찰되지 않았으며, 특히 CLL-C군의 연골세포는 뚜렷한 연골세포 방을 구성하고 있었다. Safranin O-fast 염색으로 관찰한 결과, 정상군의 관절연골 조직에서는 safranin O에 대한 염색성이 뼈 조직과 접한 곳에서 강한 양성반응을 보였다. 대조군의 연골조직에서는 safranin O에 대한 염색성이 매우 낮았으며, 뼈 조직에서 다소 높게 나타났다. CLL-A군에서는 뼈 조직과 접한 연골조직에서 safranin O에 대한 양성반응을 보였다. CLL-B군에서도 뼈 조직과 접한 곳의 연골조직에서 safranin O에 대한 양성반응이 나타났으며, CLL-C군에서는 보다 넓은 영역에서 양성반응이 나타났다. 이로 보아 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두에서 조직이 재생되고 있음을 알 수 있고, 특히 CLL-C군에서 가장 좋은 재생효과가 있음을 알 수 있다.

이상의 결과로 보아 강황약침은 CFA로 유발된 류마티스성 관절염을 유효하게 개선할 수 있는 것으로 나타났으며, 그 작용은 주로 염증상태를 개선하여 그 영향을 미치는 것으로 생각된다. 강황약침은 농도에 있어서는 투여 기준량의 1/10배 농도(CLL-A군)에서도 유효성을 보였으나 투여 기준량의 1배 농도(CLL-C군)에서 가장 좋은 효과를 보였고, 기간은 보통 8일(4회 치료) 이상 시술에서 효과적임을 알 수 있었다. 약침의 농도와 기간에 따라 효과에 차이가 있으므로 향후 임상적인 활용을 위해 이에 대한 더 많은 연구 필요하리라 생각되며 안정성 및 작용기전에 관해서도 더욱 상세한 연구가 필요하리라 생각된다.

Ⅴ. 결 론

족삼리 혈위에 대한 강황약침의 효과를 관찰하기 위하여 CFA로 유발된 흰쥐에게 농도별로 시술하여 족부종, 이질통, 혈청 aminotransferase, 혈액학적 및 조직학적 변화를 관찰한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 족부종 변화에 있어서 대조군에 비교하여 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 감소가 나타났다
2. 이질통 지표 중 reaction time 변화에서 대조군에 비하여 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다.
3. 이질통 지표 중 force intensity 변화에서 대조군에 비하여 CLL-A군, CLL-B군, CLL-C군 모두 유의한 증가가 나타났다.
4. 혈청 aminotransferase 변화 및 혈액학적 변화에 있어서 대조군에 비하여 AST의 경우 CLL-C군이 유의한 감소가 나타났다.
5. 조직학적 관찰에서 hematoxylin & eosin 염색의 경우 실험군은 대조군에 비해 연골세포들이 정상군과 비슷한 소견을 보였으며, safranin O-fast 염색에서 실험군은 뼈 조직과 접한 연골조직에서 safranin O에 대한 양성반응이 높게 관찰되었다.

Ⅵ. References

1. The Korean Society of Pathologists. Textbook of Pathology. 5th ed. Seoul : Komoonsa. 2003 : 960.
2. Harrison's Principles of Internal Medicine Edit committee of the Korean Association of Internal Medicine. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. Seoul : MIP corporation. 2003 : 1990-9.
3. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. Acupuncture and Moxibustion Medicine. Gyeonggi : Jipmoondang. 2012 : 562, 577-82.
4. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine, Oriental Rehabilitation Medicine. 2nd ed. Seoul : Koonja. 2005 : 83.
5. Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvant. Proceedings of the society for experimental biology and medicine. 1956 ; 91(1) : 95-101.
6. Seo DM, Park DS, Kang SK. The Analgesic Effect of Bee Venom Aqua-acupuncture and Its Mechanism in the Rat Model with adjuvant-induced Arthritis. The Journal of Korean Acupunture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(2) : 85-97.
7. Ryu MS, Yun YC, Kim JH. The Effect of *Angelica gigas* N_{AKAI} Pharmacopuncture at ST_{36} and BL_{23} on Freund's Adjuvant Arthritis on Rats. The Journal of Korean Acupunture & Moxibustion Society. 2010 ; 27(5) : 25-34.
8. Koo MS, Yoon JH, Kim KH, Jang JH, Lee SD, Kim KS. The Effect of Bupleuri Radix Herbal: acupuncture Solution on Immune Responses to Adjuvant Induced Arthritis in Mice. The Journal of Korean Acupunture & Moxibustion Society. 2002 ; 19(3) : 51-63.
9. Chang TY, Park HS, Shin SH. Effects of Achyranthis Radix Aqua-acupuncture on Adjuvant Athritis in Rats. Journal of Korean Medicine. 2000 ; 21(3) : 77-87.
10. Shin JW, Park JY, Park HS. Experimental study on Cervi Cornu on Adjuvant Arthritis in rats. The Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2002 ; 5(1) : 113-33.
11. Science Commitee of Korean Pharmacopuncture Institute, Pharmacopuncture Medicine Laboratory. Pharmacopuncturology. Seoul : Elsevierkorea. 2011 : 3-8.
12. College of Oriental Medicine Herbalogy Compilation Committee. Herbalogy. Seoul : Younglimsa. 2004 : 457.
13. Yoon JH, Ryu BH, Kim JS, Yoon SH. Effects of Curcuma longa L. on Some Kinds of Cancer Cells. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2006 ; 27(2) : 429-43.
14. Cho SI. Curcuma Longa L. Extract Controls Cancer Cell(Sarcoma 180) Growth. Korean Journal of Herbalogy. 2005 ; 20(4) : 27-31.
15. Lee SH, Ahn YM, Ahn SY, Kim YO, Lee BC. The Antihyperplastic Effect of Oral Curcuma longa Ingestion in a Rat Model of Benign Prostatic Hyperplasia. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2009 ; 30(2) : 355-64.
16. No HS. Effects of Curcumae Longae Rhizoma on the Dieted-induced Hyperlipidemia in Rats. Semyung Univ. 2005.
17. Kim SD. Effects of Curcuma longa Rhizoma(CLR) on Chronic Renal Failure in Rats. Dongshin Univ. 2008.
18. Choi WS. Inhibitory Effects of Rhizoma Curcumae Longae on the Cerulein-induced Acute Pancreatitis in Mice. Wonkwang Univ. 2008.
19. An HG. Result of antioxidative activity in *Curcuma longa* L.(Zingiberaceae) attenuates oxidative stress after endotoxin intoxication and suppresses the increased hepatic and renal ornithine decarboxylase activities induced by oxidative stress in mice. Dongguk Univ. 2005.
20. Lee YG. Anti-inflammatory Activities of Plant Extracts used for Treatment of Arthritis. Chonbuk Univ. 2010.
21. Yang YG. Huangjenaegyeong Somun Seokhae(黃帝內經素問釋解). Seoul : Seongbosa. 1980 : 81.
22. Jang GB. Complete Works of Zhang Jingyue(景岳全書). Seoul : DS Print. 1988 : 229.
23. Yi C. Wonbonpyeonju Euhakibmun(原本編註醫學入門). Seoul : Namsandang. 1989 : 452-3.
24. Wand D. Oidaibiyo(外臺秘要). Seoul : DS Print.

1992 : 440-1.
25. Lee SN, Seo IB, Son JB, Kim HK, Leem KH. Effects of Extruded Acanthopanax Folium Extracts on Complete Freund's Adjuvant Induced Arthritis of Rats. Korean Journal of Herbalogy. 2009 ; 24(3) : 87-96.
26. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. Acupuncture and Moxibustion Medicine. Gyeonggi : Jipmoondang. 2008 : 63-4.
27. Textbook of Pain Compilation Committee. Textbook of Pain. Seoul : Jeongdam. 2002 : 63-4.
28. Kim BS. Effect of Corydalidis Tuber, Paeoniae Radix Rubra, Carthami Flos Complex Herbal Acupuncture on Inflamation and Liver in Rats with Arthritis induced by Freund's Complete Adjuvant. Kyungwon Univ. 2004.
29. Na CS, Youn DH, Kim JS, Chae WS. The effect of Gihyeolgwanjeolbang-A(CWS-A) on adjuvant-induced arthritis in rats. Korean Journal of Herbalogy. 2012 ; 27(1) : 1-10.
30. Yi KN, Kwon OH. Clinical Pathology File. 3rd ed. Seoul : Eui-Hak Publishing and Printing Company. 2003 : 334-7, 1060-91.