

## 인동등과 봉독약침이 Adjuvant 투여로 유발된 류마티드 병태모델에 미치는 실험적 연구

배명현 · 염승룡 · 김진희 · 권영달  
원광대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

### Experimental Study of *Lonicerae Caulis* and Bee-venom Acupuncture on the Rheumatic Pathologic Model Induced by Adjuvant in Rats

Myung-Hyun Bae, K.M.D., Seung-Ryong Yeam, K.M.D., Jin-Hee Kim, K.M.D., Young-Dal Kwon, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

**Objectives** This study was carried out to investigate the experimental effects of *Lonicerae Caulis* and Bee-venom Acupuncture in Yanglingquan (陽陵泉, GB34) that have clinical efficacy in the Rheumatoid Arthritis.

**Methods** Materials of present study are *Lonicerae Caulis* Extracts (LCE), Bee-Venom Acupuncture (BVP), Sprague-dawley rats (250 g or so, ♂), and various kinds of needing experimental studies. We measured several experimental items of the rats with the arthritis induced by Freund's complete adjuvant (0.2 ml/kg), such as body weight, rate of paw edema, analgesic effect by hot plate method, WBC, TNF- $\alpha$  cytokine and IL-10 cytokine. Rats were divided into four groups; Normal group that was treated with normal saline 1.0 ml (o.p) and 15  $\mu$ l/kg (GB34) to normal rats, Control group that was treated with normal saline 1.0 ml (o.p) and 15  $\mu$ l/kg (GB34) to pathologic model rats induced by Freund's complete adjuvant 0.2 ml/kg, Experimental group A that was treated with LCE 1.0 ml (o.p) and normal saline 15  $\mu$ l/kg (GB34) to pathologic model rats induced by Freund's complete adjuvant 0.2 ml/kg and Experimental group B that was treated with LCE 1.0 ml (o.p) and BVP 15  $\mu$ l/kg (GB34) to pathologic model rats induced by Freund's complete adjuvant 0.2 ml/kg, and the experiment took over after 28 days. The results were analysed using SPSS for windows 12.0.

**Results** Experimental group A showed the increase in body weight, paw licking times and IL-10 cytokine compared to Control group. Also it was decreased in rate of paw edema, WBC, and TNF- $\alpha$  cytokine compared with Control group. Experimental group B showed the increase in body weight, paw licking times, and IL-10 cytokine compared to Control group, and showed the decrease in rate of paw edema, WBC and TNF- $\alpha$  cytokine compared to Control group. Especially TNF- $\alpha$  cytokine and rate of paw edema were accepted statistical significance compared with Control group.

**Conclusions** It is suggested that *Lonicerae Caulis* (o.p) and Bee-venom Acupuncture (GB34) can be used in the treatment of rheumatoid arthritis. (**J Korean Med Rehab 2015;25(1):17-26**)

본 연구는 2013년 원광대학교  
교내지원에 의해서 수행되었습니다.

RECEIVED December 29, 2014  
ACCEPTED January 16, 2015

CORRESPONDING TO  
Young-Dal Kwon, Department of  
Rehabilitation Medicine of Korean  
Medicine, College of Korean  
Medicine, Wonkwang University,  
543-8, Juwol 1-dong, Nam-gu,  
Gwangju 503-310, Korea

TEL (062) 670-6452  
FAX (062) 670-6767  
E-mail kwonyd@wonkwang.ac.kr

Copyright © 2015 The Society of  
Korean Medicine Rehabilitation

**Key words** *Lonicerae Caulis*, Bee-venom Acupuncture, Yanglingquan, GB34, Rheumatoid Arthritis, Freund's complete adjuvant

## 서론»»»»

류마티오이드 관절염(rheumatoid arthritis)은 가장 흔한 류마티스 질환이다. 주로 20~40세 사이에 발병하며 만성적이고 간헐적인 관절 염증을 나타낸다. 류마티오이드 관절염에 걸린 관절에는 CD4와 CD8 T세포, B세포, 림프구, 형질세포, 호중구 및 대식세포 등의 백혈구가 관절 활액막에 침윤한다. 활성화된 자가면역 CD4 T세포는 대식세포를 활성화시켜 염증이 일어난 활액막에 염증 전구 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 및 IL-7을 분비하며, 이는 조직 파괴를 더욱 증가시킨다. 관절 내의 염증세포에서 만들어진 단백질 분해효소와 아교질 분해효소가 연골과 인대나 힘줄과 같은 지지 구조물, 그리고 궁극적으로 뼈를 손상시켜 관절의 변형과 강직을 초래한다<sup>1)</sup>.

한의학에서 風寒濕熱의 邪氣가 經絡으로 침입하거나 關節에 응체됨으로써 血氣運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利가 일어나는 병을 骨關節의 痺症이라 하며 이는 현대의 류마티오이드 관절염의 임상증상과 유사하다<sup>2)</sup>.

Adjuvant 유발 관절염은 열처리된 acid-fast bacilli, mineral oil, emulsifying agent를 섞어 complete Freund's adjuvant를 쥐에 주사하여 만드는 관절염으로, 류마티오이드 관절염 및 만성 염증성 통증에 관한 실험에 널리 쓰이고 있다<sup>3)</sup>.

인동등은 淸熱解毒藥 중 하나로 인동과(Caprifoliaceae)에 속한 다년생 半常綠 纏繞灌木인 인동(Lonicera japonica Thunb.)의 莖枝이며, 淸熱解毒 疏風通絡의 效能을 가지며, 經絡을 통하게 하는 작용이 있어 經絡에 風熱을 없애 止痛시켜 風熱痺痛과 關節紅腫熱痛 등 經絡이 不舒하여 된 證을 치료하는데 상용하므로<sup>4)</sup>, 저지는 류마티오이드 관절염 병태모델에 인동등이 효과가 있을 것으로 사료되어 경구투여 약물로 선정하였다.

관절염 치료법의 하나인 봉독약침요법은 꿀벌(Apis mellifera)의 독낭에 들어 있는 독을 인위적으로 추출, 정제하여 질병과 유관한 부위 및 경혈에 주입함으로써 자침의 효과와 봉독이 지니고 있는 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하는 요법이다<sup>5)</sup>.

足少陽膽經에 속한 양릉천혈은 膝關節炎, 膝關節痛, 下肢麻木不伸, 下脚痛, 筋痙攣 등의 主治를 가지며<sup>6)</sup>, 김 등<sup>7)</sup>이 수행한 문헌고찰에 의하면 류마티오이드성 슬관절염에

양릉천혈이 예로부터 가장 많이 사용되었다고 하였다.

이에 저지는 류마티오이드 관절염에 효과가 있을 것으로 기대되는 인동등 추출물의 경구투여와 양릉천혈에 봉독 약침을 시술하는 것에 관한 실험적 연구로 병행 치료 효과를 규명코자 하였다.

따라서 저지는 Freund's complete adjuvant 시약을 백서에 투여하여 류마티오이드 관절염을 유발시킨 후, 인동등 추출물만을 투여하였을 때와 양릉천혈에 봉독 약침을 병용 시술하였을 때 나타나는 체중의 변화, 부종을 억제 및 진통효과, WBC 변화 그리고 혈청 내 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 변화 및 항염증 작용을 가진 IL-10의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 약물

본 연구에 사용된 인동등(Lonicerae Caulis)<sup>8)</sup>은 인동과에 속한 다년생 半常綠 纏繞灌木인 인동(Lonicera japonica Thunb.)의 莖枝로 가을과 겨울에 채취하여 曬乾한 것으로 (주)음니허브에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 동물

본 연구에서는 Sprague-dawley계 흰쥐(250±10g, 수컷)를 1주일 이상 적응시킨 후 실험에 적용하였다. 사육실의 온도는 20±3°C 하였고, 습도는 55±5%를 유지하였으며, 명암은 12시간주기로 조절하였다. 고형 pellet 사료(등록성분량 : 조단백질 22.1% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제·삼양프리믹스-무첨가 1.3%)와 물을 자유로이 섭취하게 하였다(동물실험 승인번호 : 2014-05-01-02).

#### 3) 약침액

본 연구에 사용한 봉독 약침액은 원광대광주한방병원에서 희석된 약침액을 공급 받아 사용하였다. 봉독은 벌을 전기 자극하여 채집 가능한 건조 봉독(유밀농원, 한국)을 정선하여 멸균생리식염수(대한약품공업주식회사, 한

국) 100 cc에 10,000 : 1 (0.01% 환산)로 희석하고 밀봉한 봉독액을 사용하였다.

#### 4) 시약 및 기기

관절염 유발에 사용된 시약은 Freund's complete adjuvant (Sigma F5881, USA), 사이토카인을 측정하기 위한 시약은 rTNF- $\alpha$  ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)와 rIL-10 ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)를 사용하였으며, 기기는 Plethysmometer (7150 UGO Basile Italy, Digital), Hot plate (DS37), Hema Vet 5 (Italy), Basic (70VB0358, SECOMAM, France), Balancs (E-210DS) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

인동등(Lonicerae Caulis) 400.0 g을 1,500 ml 증류수와 함께 상온에서 100°C 2시간 동안 전탕한 후, 전탕액을 1,500 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 그 후 감압 농축기(Rotary vacuum evaporator, EYELA Co., Japan)를 이용하여 100 ml로 농축한 다음 동결 건조하여 인동등 건조분말(Lonicerae Caulis extracts, LCE) 31.2 g을 얻었다.

### 2) 약침액의 희석

봉독약침(bee venom acupuncture, BVP)을 개봉한 후, 생리식염수에 1/10,000의 농도로 희석하여 사용하였다. 희석된 약침액은 0.22 mm syringe filter (BD, U.S.A.)로 filtering하여 사용하였다.

### 3) 혈위

혈위는 양릉천(GB34)에 해당되는 상응 부위<sup>9)</sup>로 선정하였다. GB34에 상응하는 부위는 슬관절하 1寸에 해당하는 부위로 비골소두 전하방 함몰된 곳이다.

### 4) 류마티드 병태 모델 유발

병태 모델 유발은 Freund's complete adjuvant 시약 0.2 ml/kg를 흰쥐의 우측뒷다리 발바닥부위에 주입하고 14일이 경과한 후에 발적, 부종이 인정된 흰쥐만을 선정하여 실험에 사용하였다.

### 5) 실험군 분류 및 검액 투여

실험군은 정상군(Normal group), adjuvant 관절염이 유발된 대조군(Control group), adjuvant 관절염 유발 후 인동등 추출물을 경구투여하고 생리식염수를 주입한 실험군 A (Experimental A), adjuvant 관절염 유발 후 인동등 추출물을 경구투여하고 봉독약침을 주입한 실험군 B (Experimental B)로 총 4개의 군으로 구분하였다. 각 실험군은 무작위로 8마리씩 분류하여, 정상군과 대조군은 연구 개시 14일 후부터 14일 동안 매일 1회 생리식염수 1.0ml을 경구투여하면서 GB34부위에 생리식염수 15  $\mu$ l/kg을 주입하였다. 실험군 A는 연구 개시 14일 후부터 14일 동안 매일 1회 LCE 500 mg/kg 1.0 ml을 경구투여하면서 GB34부위에 생리식염수 15  $\mu$ l/kg을 대조군과 동일한 방법으로 주입하였고, 실험군 B는 연구 개시 14일 후부터 14일 동안 매일 1회 LCE 500 mg/kg 1.0 ml과 GB34에 BVP 15  $\mu$ l/kg을 주입하였다. 단, 혈액학적 변화를 관찰하기 위해 모든 동물들을 하루 전에 절식시켰다.

### 6) 체중 변화 측정

체중의 변화는 실험개시, adjuvant 시약 처치 14일 후 병태모델 유발을 확인한 다음, 그리고 연구 종료 시 동물의 체중을 전자저울을 이용하여 측정하였다.

### 7) 부종 억제 효과 측정

Winter<sup>10)</sup> 등의 방법을 이용, Plethysmometer로 측정된 후 부종이 유발되지 않은 좌측뒷다리 발바닥 체적과의 차로 산출하였다.

$$\text{부종율(\%)} = \left( \frac{\text{우측뒷다리 발바닥 체적} - \text{좌측뒷다리 발바닥 체적}}{\text{우측뒷다리 발바닥 체적}} \right) \times 100$$

### 8) Hot plate method에 의한 진통효과 측정

열판(가로 32 cm, 세로 27 cm, 높이 16 cm)의 온도가 55 $\pm$ 0.5°C가 되도록 하여 정상군, 대조군, 실험군 A, 실험군 B를 열판에 놓은 다음 처음 회피반응 시간을 측정하여 진통효과를 관찰하였다.

9) 혈액학적 변화 측정

부종과 진통 실험을 마친 후 흰쥐를 우레탄 마취 하에서 심장 채혈한 다음 채혈한 혈액 중 1.0 ml은 Ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA)-2K bottle에 담아 잘 혼합시킨 후, Fonio법<sup>11)</sup>에 준하여 Hema Vet 5로 WBC를 측정하였다.

10) Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  측정

상기 방법과 같이 혈청을 분리한 후 혈청 내에서 생성되는 TNF- $\alpha$ 를 rTNF- $\alpha$  ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 rTNF- $\alpha$  standard diluent buffer 50  $\mu$ l를 넣은 다음, 나머지 well에 혈청과 control (high, low)을 각각 50  $\mu$ l씩 분주한 후 standard diluent buffer 50  $\mu$ l를 넣었다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rTNF- $\alpha$  50  $\mu$ l를 넣고 실온에서 90분 동안 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 45분 동안 incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하였다. 그 다음 stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다<sup>12,13)</sup>.

11) Intereukin (IL)-10 측정

상기 방법과 같이 혈청을 분리한 후 혈청 내에서 생성되는 IL-10을 rIL-10 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 standard diluent buffer 100  $\mu$ l씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control (high, low)을 각각 50  $\mu$ l씩 분주한 다음 standard diluent buffer 50  $\mu$ l를 넣었다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rIL-10 50  $\mu$ l를 넣고 실온에서 2시간 incubation한 다음 washing buffer로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 후 washing buffer로 4회 세척하였다. 그 다음 stabilized chromogen을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 stop solution을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에

서 측정하였다<sup>14,15)</sup>.

3. 통계처리

수집된 데이터의 통계처리는 SPSS 12.0 ver. for windows program을 사용하였으며, 3개 이상의 군은 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 통계적으로 유의한 경우 사후검정(post hoc)은 Tukey 방법을 시행하였고, 2개의 군간의 비교는 independent sample t-test를 사용하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

결과»»»»

1. 체중 변화에 미치는 효과

류마티오이드 관절염(rheumatoid Arthritis, RA) 병태 모델에 인동등 추출물(Lonicerae Caulis extracts, LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(Bee Venom acupuncture, BVP)을 병용 투여하였을 때 변화되는 체중을 측정한 결과 다음과 같았다.

연구개시 전 229.6 $\pm$ 2.80 g이었던 정상군의 체중은 연구 개시 2주 후에 335.6 $\pm$ 7.00 g으로 증가하였고, 생리식염수 1.0 ml과 GB34에 생리식염수 15  $\mu$ l/kg을 14일 동안 처리하였을 때는 378.0 $\pm$ 10.03 g으로 연구 개시 전보다 64.64% 증가하였다.

연구개시 전 232.0 $\pm$ 1.28 g이었던 대조군의 체중은 병태모델 유발 후에는 322.5 $\pm$ 5.54 g으로 증가하였고, 생리식염수 1.0 ml과 GB34에 생리식염수 15  $\mu$ l/kg을 14일 동안 처리하였을 때는 355.6 $\pm$ 7.11 g으로 연구 개시 전보다 53.3% 증가하였지만 정상군에 비해서는 감소되었다.

연구개시 전 231.8 $\pm$ 1.88 g이었던 실험군 A의 체중은 병태모델 유발 후에는 329.4 $\pm$ 5.66 g으로 증가하였고, LCE 500 mg/kg과 GB34에 생리식염수 15  $\mu$ l/kg을 14일 동안 처리하였을 때는 365.1 $\pm$ 4.92 g으로 연구 개시 전보다 57.5%로 대조군에 비해서도 증가하였다.

연구개시 전 227.1 $\pm$ 1.14 g이었던 실험군 B의 체중은 병태모델 유발 후에는 330.3 $\pm$ 3.85 g으로 33.7%로 증가하였고, LCE 500 mg/kg과 GB34에 BVP 15  $\mu$ l/kg을 14일 동안 처리하였을 때는 369.0 $\pm$ 1.60 g으로 연구 개시

전보다 62.2%로 대조군에 비해서도 증가하였다(Fig. 1).

## 2. 부종율에 미치는 효과

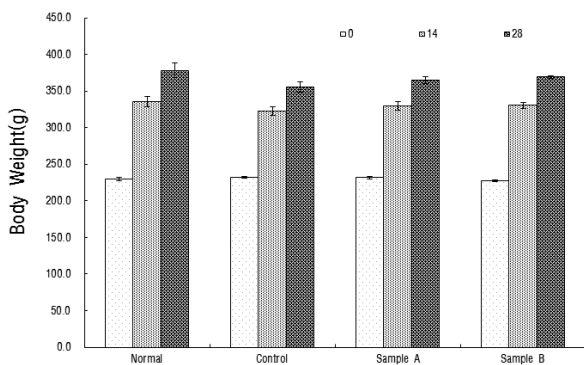
류마티드 관절염 병태 모델에 인동등 추출물(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(BVP)을 병용 투여하였을 때 변화되는 부종율을 측정된 결과 다음과 같았다.

우측뒷다리 발바닥 체적과 좌측뒷다리 발바닥 체적을 비교한 체적차를 부종율로 산정한 결과, 정상군의 부종율을 0%라 하였을 때, 대조군의 부종율은  $54.80 \pm 1.62\%$ 로 증가하였다. 실험군 A의 부종율은  $51.62 \pm 1.57\%$ 로 대조군의 부종율보다 감소하였고, 실험군 B의 부종율도  $48.6549.79 \pm 1.53\%$ 로 대조군의 부종율보다 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다(Fig. 2).

## 3. 진통에 미치는 효과

류마티드 관절염 병태 모델에 인동등 추출물(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(BVP)을 병용 투여하였을 때 변화되는 회피반응 시간을 측정된 결과 다음과 같았다.

처음 회피반응 시간은 정상군이  $4.93 \pm 0.13$  sec이었지만 대조군에서는  $3.35 \pm 0.27$  sec로 정상군의 처음 회피반응 시간보다 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 단축되었다. 그러나 실험군 A의 처음 회피반응 시간은  $4.36 \pm 0.39$  sec로, 실험군 B의 시간도  $4.80 \pm 0.09$  sec로 대조군에 비해 연장되었다(Fig. 3).

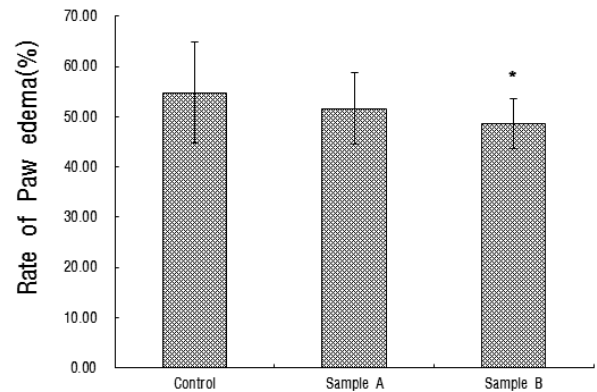


**Fig. 1.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the Body Weight in Rats Induced by Freund's Complete Adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats.

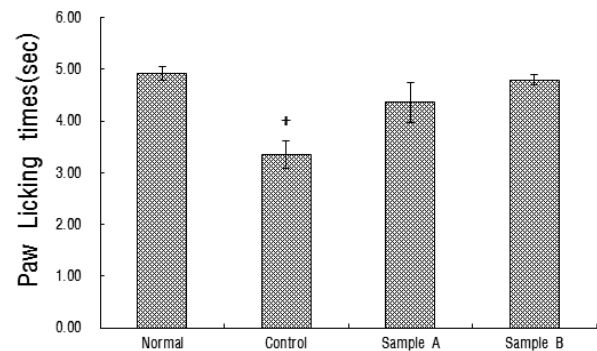
## 4. 백혈구 수에 미치는 효과

류마티드 관절염 병태 모델에 인동등 추출물(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(BVP)을 병용 투여하였을 때 변화되는 백혈구 수를 측정된 결과 다음과 같았다.

정상군의 WBC는  $5.14 \pm 0.47 (\times 10^3 / \mu l)$ 이었지만 대조군의 WBC는  $6.67 \pm 0.23 (\times 10^3 / \mu l)$ 로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 그러나 실험군 A와 실험군 B의 WBC는 각각  $6.34 \pm 0.46 (\times 10^3 / \mu l)$ 와  $5.42 \pm 0.20 (\times 10^3 / \mu l)$ 로 대조군의 WBC에 비해 감소하였다(Fig. 4).



**Fig. 2.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the Rate of Paw Edema in Rats Induced by Freund's Complete Adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats. \*Statistically significant compared with Control (\* $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the Paw Licking Times in Rats Induced by Freund's Complete Adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats. <sup>+</sup>Statistically significant compared with Normal (<sup>+</sup> $p < 0.05$ ).

### 5. TNF- $\alpha$ 양에 미치는 효과

류마티오이드 관절염 병태 모델에 인동등 추출물(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(BVP)을 병용투여하였을 때 변화되는 TNF- $\alpha$  양을 측정된 결과 다음과 같았다.

정상군의 TNF- $\alpha$  양은  $88.73 \pm 1.02\%$ 이었지만 대조군의 TNF- $\alpha$  양은  $100.00 \pm 1.62\%$ 로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 증가하였다. 그러나 실험군 A의 TNF- $\alpha$  양은  $97.38 \pm 1.96\%$ 로 대조군에 비해 감소하였고, 실험군 B의 TNF- $\alpha$  양은  $91.55 \pm 1.45\%$ 로 대조군의 TNF- $\alpha$  양에 비해 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소하였다(Fig. 5).

### 6. IL-10 양에 미치는 효과

류마티오이드 관절염 병태 모델에 인동등 추출물(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독 약침(BVP)을 병용 투여하였을 때 변화되는 IL-10 양을 측정된 결과 다음과 같았다.

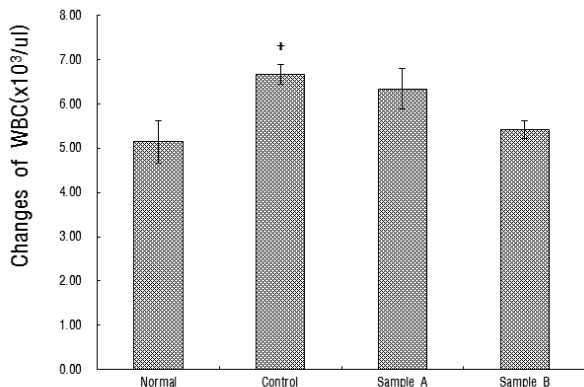
정상군의 IL-10 양은  $115.10 \pm 2.62\%$ 이었지만 대조군의 IL-10 양은  $100.00 \pm 1.06\%$ 로 정상군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다. 그러나 실험군 A와 실험군 B의 IL-10 양은 각각  $107.35 \pm 1.37\%$ 와  $110.20 \pm 0.82\%$ 로 대조군의 IL-10 양에 비해 증가하였다(Fig. 6).

### 고찰»»»»

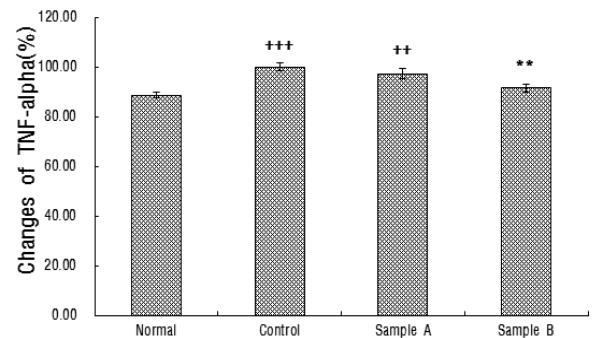
류마티오이드 관절염은 원인불명의 만성 전신성 질환이며, 말단 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염으로 대칭적으로 분포하면서 연골의 파괴와 골미란(erosion)을 일으키고 결국 관절의 변형을 가져오는 질환이다<sup>16)</sup>.

류마티오이드 관절염의 국내 유병률은 보건복지부에서 2013년에 발행한 국민건강통계에 따르면 만30세 이상 기준으로 약 2%로 남녀 성비는 남 : 여=1.1 : 2.8 정도이며<sup>17)</sup>, 직접적인 원인이 아직 규명되어 있지는 않지만, 환경적인 요인과 유전적 소인이 복합적으로 작용하여 관절염이 발생하는 것으로 추정하고 있다.

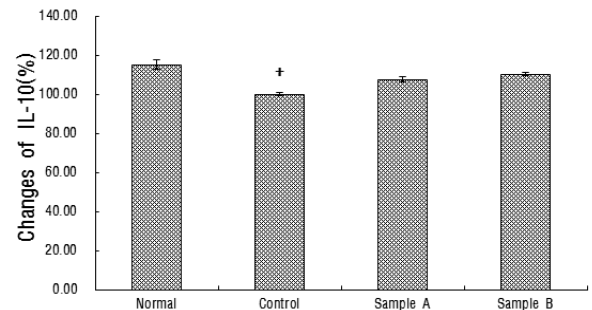
류마티오이드 관절염을 치료하기 위해 아스피린과 비스



**Fig. 4.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the WBC in rats induced by Freund's complete adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats. <sup>+</sup>Statistically significant compared with Normal (<sup>+</sup> $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the TNF- $\alpha$  in rats induced by Freund's complete adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats. <sup>+</sup>Statistically significant compared with Normal (<sup>++</sup> $p < 0.01$ , <sup>+++</sup> $p < 0.001$ ). <sup>\*</sup>Statistically significant compared with Control (<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ).



**Fig. 6.** Effects of LCE and BVP (GB34) on the IL-10 in rats induced by Freund's complete adjuvant. The data were expressed as Means $\pm$ SE in 8 rats. <sup>+</sup>Statistically significant compared with Normal (<sup>+</sup> $p < 0.05$ ).

테로이드성 소염제, 스테로이드, DMARD (disease modifying antirheumatic drugs), 면역억제제, 사이토카인 억제제 등을 사용하고 있으며<sup>18)</sup>, 이들 약제의 목적은 1) 만성적으로 진행되는 염증 현상을 적절하게 조절함으로써, 2) 결과적으로 임상적 증상인 부종과 통증을 완화시키고, 3) 골과 연골의 손상과 파괴를 억제하여 관절의 변형과 신체적인 불구를 방지하고 4) 삶의 질을 개선함으로써 사회 복귀를 촉진하며, 5) 전신적인 염증 현상을 조절하는 것이라고 할 수 있다<sup>19)</sup>.

한의학에서痺란閉, 즉 막혀서 잘 통하지 않는다는 뜻이며, 骨關節의痺症은風寒濕熱의邪氣가 인체의營衛失調, 腠理空疎 혹은正氣虛弱한 틈을 타고經絡으로 침입하거나關節에 응체됨으로써血氣運行을 저해하여肌肉, 筋骨, 關節에麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利, 심하면 관절의 강직성 변형을 초래하는 병증의 하나로, 비증의 병인병리와 임상증상은 류마티오이드 관절염과 유사하다<sup>2)</sup>. 류마티오이드 관절염에 대한 연구는 유발유전자나 질병악화물질의 단백질 구조가 밝혀지고 새로운 면역조절 물질이 발견되면서, 점차 면역학적, 유전학적인 논문들이 주종을 이루고 있는 실정<sup>20)</sup>, 최근 한의학에서는 박<sup>21)</sup>, 설<sup>22)</sup>, 손<sup>23)</sup>의 논문 등에서처럼 면역학적 관점의 논문들이 발표되고 있다.

본 실험에서 사용된 병태 모델 유발물질은 adjuvant 시약으로 T세포매개 자가면역성 관절염(T cell-mediated autoimmune arthritis) 병태 모델을 유발하며, 이는 류마티오이드 관절염(RA)이나 염증질환에 있어 항염증약물을 실험하기 위해 사용된다<sup>24)</sup>.

인동등은淸熱解毒藥 중 하나로 인동과(Caprifoliaceae)에 속한 다년생 半常綠 纏繞灌木인 인동(Lonicera japonica Thunb.)의莖枝이며,淸熱解毒 疏風通絡 治溫病發熱 熱毒血痢 癰腫瘡瘍 風濕熱痺 關節紅腫熱痛의效能 主治를 가지며, 성미가甘寒하여淸熱解毒시키는 작용이 있고, 그解毒작용이 금은화에 미치지 못하나,經絡을 통하게 하는 작용이 있어經絡에風熱을 없애止痛시키므로風熱痺痛과關節紅腫熱痛 등經絡이不舒하여된證을 치료하는데 상용한다<sup>4)</sup>. 최근의 연구에 따르면 면역조절작용<sup>25,26)</sup>, 혈압하강작용<sup>27)</sup> 등이 보고되었으나 인동등의 류마티오이드 관절염에 대한 효과에 대해서는 보고되지 않았기에 인동등을 경구투여약물로 선정하였다.

봉독약침요법은 살아 있는 꿀벌(Apis mellifera)의 독낭

에 들어 있는 독을 인위적으로 추출, 정제하여 질병과 유관한 부위 및 경혈에 주입함으로써 자침의 효과와 벌독이 지니고 있는 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하는 요법을 말한다<sup>5)</sup>. 봉독약침에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 소염진통에 대한 연구<sup>28,29)</sup>, 신경보호효과<sup>30)</sup>, 항암효과<sup>31,32)</sup> 등이 보고되었으며, 임상연구<sup>33-35)</sup>도 또한 활발하게 이루어지고 있다.

陽陵泉(GB34)은足少陽膽經에 속하고<sup>36)</sup> 膝關節炎, 膝關節痛, 下肢外側痛, 筋病下肢筋虛弱, 下肢麻木不伸, 下脚痛, 筋痙攣 등의主治를 가진다<sup>6)</sup>. 김 등<sup>7)</sup>에 의하면 류마티오이드성 슬관절염에 陽陵泉穴이 예로부터 가장 많이 사용되었다고 하여 陽陵泉穴을 약침 주입혈위로 선정하였다.

본 연구는 임상에서 류마티오이드 관절염(RA)에 사용될 것으로 기대되는 인동등(LCE)과 양릉천(GB34)에 봉독약침(BVP)의 효능을 실험적으로 구명하고자 adjuvant 시약으로 류마티오이드 병태모델을 유발시킨 후 LCE만을 투여하였을때와 GB34에 BVP를 병용 시술하였을 때 변화되는 체중, 부종 억제율, 회피반응 시간, WBC 그리고 혈청 내 친염증 사이토카인과 항염증 사이토카인 변화를 관찰하였다.

본 실험 결과 adjuvant 시약을 이용하여 류마티오이드 관절염을 유발한 대조군의 체중증가가 53.3%로 류마티오이드 관절염을 유발하지 않은 정상군의 체중증가의 64.64%에 비해 낮은 증가율을 보였고, 관절염 유발로 야기된 염증으로 인한 스트레스 등으로 체중이 감소하는 경향을 보였다<sup>37)</sup>. 그에 반해 나머지 실험군 A, 실험군 B 모두 체중증가가 57.5%, 62.2%로 대조군보다 증가하였다.

부종은 모세혈관이 확장되고, 혈류량이 증가하게 되며, 모세혈관의 투과성이 커짐으로써 혈장 성분이 이동되고 백혈구가 삼출되어 세포간질액의 용적이 늘어나게 되어 발생한다<sup>38,39)</sup>. 본 실험 결과 우측뒷다리 발바닥 체적과 좌측뒷다리 발바닥 체적을 비교한 체적차를 부종율로 계산한 결과 실험군 A가 51.62±1.57%, 실험군 B가 48.65±1.53%로 실험군 A, B 모두에서 대조군의 54.80±1.62% 부종증가율보다 억제되었고, 특히 인동등 추출물 경구투여와 함께 봉독약침을 시술한 실험군 B의 부종율이 대조군보다 유의성(p<0.05)있게 억제되었다. Lewis는 염증이 증가하면 부종이 증가하므로 부종의 억제를 평가함으로써 간접적으로 소염효과를 확인할 수 있다고 하였

다<sup>40)</sup>. 이는 본 시술이 adjuvant로 유발된 관절염에 의해 발생한 부종에 대해 부종억제효과가 있음을 나타내 주는 결과라 사료된다.

진통효과측정에서 대조군의 처음 회피반응 시간이  $3.35 \pm 0.27$  sec로 정상군의  $4.93 \pm 0.13$  sec보다 유의성 있게 단축되었는데( $p < 0.05$ ), 이는 관절염이 통증과민을 유발한다는 보고와 일치하며<sup>41)</sup>, 실험군 A가  $4.36 \pm 0.39$  sec, 실험군 B가  $4.80 \pm 0.09$  sec로 두 실험군 모두 처음 회피반응 시간은 대조군보다 연장되었다. 이는 인동등 경구투여와 봉독약침 시술로 인해 류마티드 관절염 유발로 야기된 부종이 감소하고 쥐의 발바닥에서 느껴지는 열 감도가 감소하여 진통시간이 연장된 것으로 사료된다.

WBC측정에서 대조군의 WBC는  $6.67 \pm 0.23$  ( $\times 10^3/\mu l$ )로 정상군의  $5.14 \pm 0.47$  ( $\times 10^3/\mu l$ )에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 이는 류마티드 관절염을 유발한 대조군이 정상군에 비해 유의하게 염증이 증가하였음을 나타내준다. 이에 반해 실험군 A와 실험군 B의 WBC는 각각  $6.34 \pm 0.46$  ( $\times 10^3/\mu l$ )와  $5.42 \pm 0.20$  ( $\times 10^3/\mu l$ )로 대조군의  $6.67 \pm 0.23$  ( $\times 10^3/\mu l$ )에 비해 감소하였다. 이는 인동등 경구투여와 봉독약침 시술로 인해 류마티드 관절염 유발로 야기된 염증반응이 감소하여 백혈구 수치가 감소한 것으로 사료된다.

TNF- $\alpha$ 는 면역반응의 발현과 조절에 있어 중요한 역할을 담당하는 친염증성 사이토카인으로<sup>42)</sup> 류마티드 관절염 환자의 활막 조직에서 TNF- $\alpha$ 의 mRNA와 단백질 발현이 보고되었고<sup>43,44)</sup>, In Vitro 실험에서 TNF- $\alpha$ 는 연골과 뼈의 흡수를 촉진됨이 보고되었으며<sup>45,46)</sup>, 류마티드 관절염 환자에 항 TNF- $\alpha$  항체를 투여한 경우 방사선 검사상 관절과괴의 진행이 억제됨이 보고되어<sup>47)</sup> TNF- $\alpha$ 가 류마티드 관절염에서 병리적으로 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 본 실험 결과 류마티드 병태모델을 유발한 대조군의 TNF- $\alpha$  양이  $100.00 \pm 1.62\%$ 로 정상군의 TNF- $\alpha$  양인  $88.73 \pm 1.02\%$ 에 비해 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 증가하였다. 실험군 A의 TNF- $\alpha$  양은  $97.38 \pm 1.96\%$ 로 대조군에 비해 감소하였고, 실험군 B의 TNF- $\alpha$  양은  $91.55 \pm 1.45\%$ 로 대조군의 TNF- $\alpha$  양에 비해 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소하였다(Fig. 5). 이를 보아 인동등 경구투여와 봉독약침 병용시술이 인동등 단독 경구투여보다 류마티드 관절염 모델치료에 더 효과적일 것이라 사료된다.

IL-10은 18.5 kDa의 160개 아미노산으로 이루어진 강

력한 항염증 작용을 가진 사이토카인으로 자가분비 (autocrine)양상으로 음성 피드백(negative feedback)작용을 함으로써 자체 생성을 조절하게 되며, 생성된 IL-10은 염증을 일으키는 데 관여하는 사이토카인인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, TNF, G-CSF, GM-CSF 그리고 IL-8과 MIP-1 $\alpha$ 와 같은 케모카인의 합성을 저해하여 항염증작용을 나타낸다<sup>48)</sup>. 여러 관절염 동물 모델에서 IL-10을 치료 목적으로 투여한 경우 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 생성이 감소되고 관절염의 활성이 억제되는 소견을 보였다<sup>49,50)</sup>.

본 실험 결과 대조군의 IL-10의 양은  $100.00 \pm 1.06\%$ 으로 정상군의 IL-10의 양  $115.10 \pm 2.62\%$ 보다 유의성있게( $p < 0.05$ ) 감소하였고, 실험군 A는  $107.35 \pm 1.37\%$ , 실험군 B의 IL-10의 양은  $110.20 \pm 0.82\%$ 로 대조군보다 증가하여 인동등 경구투여와 양릉천혈의 봉독약침의 병행 시술이 염증반응에 대해 항염증효과가 있을 것이라 사료된다.

이상의 실험결과들로 보아 인동등(LCE) 경구투여와 양릉천(GB34)에 봉독약침(BVP)을 시술하게 되면 치료적 중재를 전혀 하지 않은 채 adjuvant시약으로 류마티드 관절염만을 유발시킨 대조군에 비해 체중 증가와 함께 부종 억제, 진통효과 뿐만 아니라 항염증 효과, 친염증 사이토카인의 감소 및 항염증 사이토카인이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 부종율과 TNF- $\alpha$ 의 감소가 인동등(LCE) 경구투여와 양릉천(GB34)봉독약침(BVP)의 병행 시술에서 유의성있는 결과를 나타낸 것으로 보아 향후 인동등 경구투여와 양릉천 봉독약침이 각각 단독으로 시행되었을 때와 같이 쓰였을 때의 효능에 대한 비교에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이를 바탕으로 향후 임상연구를 통한 검증을 한다면 임상에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 결론»»»»

Adjuvant 시약으로 유발된 류마티드 관절염 병태모델에 미치는 효과를 알아보기 위하여 인동등 추출물을 투여한 실험군 A와 인동등 추출물 투여와 함께 양릉천에 봉독약침을 병용 시술한 실험군 B의 체중의 변화, 부종 억제율, 처음 회피반응 시간 변화, 혈액 내 WBC 변화 그리고 혈청 내 사이토카인의 변화 등을 관찰한 결과 다음



과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험군 A와 실험군 B의 체중은 연구 종료 시 대조군의 체중보다 증가하였다.
2. 실험군 A와 실험군 B의 부종율은 대조군에 비해 감소하였고, 특히 실험군 B의 부종율이 유의성 있게 억제되었다.
3. 실험군 A와 실험군 B의 처음 회피반응 시간은 대조군에 비해 연장되었고, WBC도 대조군보다 감소하였다.
4. 실험군 A와 실험군 B의 TNF- $\alpha$ 의 양은 대조군에 비해 감소하였고, 특히 실험군 B는 대조군에 비해 유의성이 인정되었다.
5. 실험군 A와 실험군 B의 IL-10의 양은 대조군보다 증가하였다.

이상의 결과, 인동등과 봉독약침이 류마티드 관절염에 유의한 효과를 나타낼 것으로 기대되며, 이를 바탕으로 향후 임상연구를 통하여 검증을 한다면 임상에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 참고문헌»»»»

1. Peter Parham, The Immune System, Third edition, 서울: 라이프사이언스, 2011:399.
2. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 서울:군자출판사. 2008:83.
3. William N. Kelly. Textbook of rheumatology, 2nd. USA W.B:Saunders company. 1985:884.
4. 한의과대학 본초학 출판위원회. 본초학. 서울:도서출판 영림사. 2007:265-6.
5. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울:ELSEVIER KOREA L.L.C.. 2008:167.
6. 전국한외과대학 침구경혈학교수. 침구학(상). 경기도:집문당. 1991:648-9.
7. 김무진, 윤중화, 김경호, 이승덕, 김갑성. 류마티스성 슬관절염의 침구치료에 관한 문헌고찰. 대한침구학회지. 2005; 22(1):191-201.
8. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 2012:265-6.
9. 전국한외과대학 침구·경혈학교수 편저. 침구학(상). 서울:집문당. 1991:648-9.
10. 韓國藥學大學協會會 藥物學分科會. 藥物學 毒性學實驗. 서울:신일상사. 1993:135.
11. 金井泉. 臨床檢査法提要. 서울:高文社. 1984.217-31,389-92,432-37.
12. Stepaniak JA, Gould KE, Sun D, Swanborg RH. A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats. J. Immunol, 1995:2762-9.
13. Rivera DL, Olistier SM, Liu X, Thompson JH, Zhang XJ, Pennline K, Azuero R, Clark DA, Miller MJ. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. FASEB J. 1998;12(2):189-97.
14. Okura, Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S, Abo T. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. Circ Res. 1998;82(10):1035-42.
15. Lobell A, Weissert R, Storch MK, Svanholm C, de Graaf KL, Lassmann H, Andersson R, Olsson T, Wigzell H. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 1998;187(9):1543-8.
16. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. HARRISON'S 내과학. 16th edition vol.2. 서울:도서출판 MIP. 2006:2148.
17. 문형표, 양병국. 2013 국민건강통계 국민건강영양조사 제6기 1차년도(2013). 보건복지부 건강정책과. 2014:703
18. 의학교육연수원. 가정의학. 서울:서울대학교출판부. 1998:837.
19. 유대현. 류마티스 관절염의 최신 치료 경향. 대한정형외과학회지. 2010;45(6):419-25.
20. 김영태, 이재동, 이운호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험논문의 경향. 대한침구학회지. 2002;19(5):190-4.
21. 박진상, 한명금, 임양의, 이수경, 신병철, 권영달, 송용선. 생체의 류마티드 관절염 실험 모델에서 청열사슴탕의 효과. 한방재활의학과학회지. 2004;14(2):29.
22. 설재욱, 신미숙, 최진봉. 마황강활탕이 Adjuvant관절염에 미치는 실험적 효과. 한방재활의학과학회지. 2005;15(2):55.
23. 손동우, 김순중, 서일복. 疼痛散이 흰쥐의 Adjuvant유발 관절염 및 척수내 C-fos발현에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2005;15(3):2
24. Van Eden W, Wagenaar-Hilbers JP, Wauben MH. Adjuvant Arthritis in the Rat. Current Protocols in Immunology. 2001;Chapter 15:Unit 15.4.
25. 이영철 권택현 옥인수 서창우 김양진 노성수 서영배. 인동등(忍冬藤)의 면역조절작용(免疫調節作用)에 대한 실험적(實驗的) 연구(研究)(II) - 인동등(忍冬藤) 각 fraction이 mice 비장세포에서 cytokines 생성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005;20(4):141-9.
26. 하태광 이영철. Chlorogenic acid 및 인동등 ethyl acetate 분획의 비장 및 흉선 세포에서의 유전자 발현 분석을 통한 면역조절효과. 대한본초학회지. 2011;26(2):1-10.
27. 유윤조. 忍冬藤 진탕액이 자연발증 고혈압 백서의 혈압에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(6):993-7.
28. 서병관, 박동석, 백용현. Collagen-induced Arthritis Rat Model에서 염증성 통증에 대한 봉독약침의 진통효과 및 기전연구: 5HT-3 & Muscarinic Cholinergic Mechanisms에 대한 연구. 대한침구의학회지. 2011;28(1):37-44.
29. 정인태, 백용현, 박동석, 최도영. 봉독약침이 collagen 유발 관절염에 미치는 진통효과 및 그 기전 연구. 대한침구학회

- 지. 2005;22(1):99-108.
30. 박원, 김재규, 김종인, 최도영, 고형균. MPTP 유발 파킨슨 병 동물 모델에 대한 봉독약침의 신경 보호 효과 및 항염증 효과. *대한침구학회지*. 2010;27(3):105-16.
  31. 박찬열, 서정철, 최도영, 안병철. 봉독약침의 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. *대한약침학회지*. 2000;3(1):1-19.
  32. 양창열, 송호섭. Bee venom의 세포자멸사를 통한 전립선 암세포의 성장 및 LNCaP의 이중이식에 미치는 영향. *대한약침학회지*. 2010;13(1):15-35.
  33. 이상훈, 홍승재, 김수영, 양형인, 이재동, 최도영, 이두익, 이윤호. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독 약침의 류마티스 관절염 치료 효과 연구. *대한침구의학회지*. 2003;20(6):80-8.
  34. 이상훈, 이현중, 백용현, 김수영, 박재경, 홍승재, 양형인, 김건식, 이재동, 최도영, 이두익, 이윤호. 봉독약침이 류마티스 관절염 환자의 관절 통증, 종창 및 급성 염증 반응에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2003;20(2):77-84.
  35. 심소라. 파킨슨병에 대한 봉독약침과 침의 임상효과 비교 연구. *경희대학교 대학원*. 2011.
  36. 전국한의과대학,한의학전문대학원 경락경혈학 교재편찬위원회. *대학경락경혈학 각론(하)*. 강원도 :의방출판사. 2009: 1024.
  37. 이동진. Adjuvant로 유발된 관절염의 흰 쥐에서 초음파의 임상반응. *한국전문물리치료학회지* 2003;10(2):45-59.
  38. 강신성. *생물 과학. 아카데미서적*. 2000:428.
  39. *대한병리학회. 병리학*. 서울:고문사. 1998:71-103, 1093-5.
  40. Lewis EJ, Bishop J, Aspinnall SJ. A simple inflammation model that distinguishes between the action of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. *Inflamm Res*. 1998;47(1):26-35.
  41. Ulett GA, Han J, Han S. Traditional and evidence-based acupuncture : history, mechanisms, and present status. *South Med J*. 1998;91(12):1115-20.
  42. Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci*. 1997;42:1557-66.
  43. Husby G, Williams RC, Jr. Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 1988;1:363-71.
  44. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34:1125-32.
  45. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986;319:516-8.
  46. Saklatvala J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*. 1986;322:547-9.
  47. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Eng J Med*. 2000;343:1594-602.
  48. *대한진단검사의학회. 진단검사의학. 제4판*. 서울:이퍼블릭. 2009:628-9.
  49. Lubberts E, Joosten LA, Van Den BL, et al. Intraarticular IL-10 gene transfer regulates the expression of collagen-induced arthritis (CIA) in the knee and ipsilateral paw. *Clin Exp Immunol*. 2000;120:375-83.
  50. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine*. 1998;10:361-9.