

원저

木防己藥鍼이 關節炎에 미치는 影響

이연경 · 이병렬

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

A Study on the Effect of Aqua-acupuncture with *Stephania Tetrandra* solution on Arthritis

Yeun-kyung, Lee · Byung-ryul, Lee

Department of Acupuncture & Moxibustion, college of Oriental Medicine Dae-Jeon University

Objective : The purpose of this study is to observe the effect of Aqua-acupuncture with *Stephania Tetrandra* Solution (ST-AS) on arthritis.

Methods : The author performed several experimental items : that is gene expression and secretion of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-2, production of ROS, paw thickness, DTH, weight of spleen, expression of CD4+, CD8+, CD19+ in the spleen, production of IL-6, TNF- α , examination of histology.

Results : The obtained results are summarized as follows.

1. IL-1 β , IL-6, TNF- α gene expression of hFLS were significantly inhibited in treatment group, and gene expression of MMP-2 was not inhibited in treatment group.
2. The secretion amount of IL-1 β , IL-6, TNF- α were significantly inhibited in treatment group.
3. Expression of P-38 MAP kinase and production of ROS were inhibited in treatment group.
4. Treatment group were significantly inhibited the incidence of arthritis, hind paw edema, the index of arthritis and DTH of CIA (collagen II-induced arthritis) mice.
5. Treatment group were significantly decreased splenic weight and the number of CD4+, CD8+, CD19+ activated cells and secretion amount of IL-6, TNF- α of CIA (collagen II-induced arthritis) mice.
6. Treatment group were expressed form of new bone, synovium, new margin in histology imperison to control group.

Conclusions : Taking all these observations into account, ST-AS injection is considered to be effective in treating arthritis and put to practical use in future arthritis clinic.

Key words : arthritis, Aqua-acupuncture, *Stephania Tetrandra*.

· 접수 : 7월 2일 · 수정 : 7월 14일 · 채택 : 7월 21일
· 교신저자 : 이병렬, 대전광역시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학 침구학교실 (Tel : 042-280-2641)
E-mail : acup@dragon.taejon.ac.kr

I. 서론

關節炎은關節部位에發生하는炎症疾患으로,臨床的으로風濕性關節炎(rheumatic arthritis),類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis) 및骨關節炎(osteoarthritis) 등으로區分되며¹⁾, 류마티스關節炎은韓醫學에서는痛風²⁻⁴⁾,歷節風²⁻⁵⁾,鶴膝風³⁻⁶⁾,白虎歷節風^{2,3)},痺痺³⁾,痺症^{2,5,7,8)} 등의範疇에屬한다²⁾고 볼 수 있다.

痺症은人體의正氣가虛한狀態에서肌肉經絡이風寒濕邪氣의侵犯으로氣血運行이不暢하게되어發生하며⁹⁾筋骨,肌肉,關節 등에疼痛,重着,麻木,關節腫大,屈伸不利,發赤 및熱感 등의症狀를 나타낸다⁹⁻¹¹⁾.

治療는祛風,散寒,除濕,清熱,化痰祛瘀,活血通絡,滋補肝腎 등^{2,12)}의方法으로艾灸 및藥物,藥鍼療法이活用되고 있다.

藥鍼療法을利用한研究로는薏苡仁,斑猫,秦艽,草龍膽,草烏,加味疎風活血湯 등이 adjuvant關節炎에,澤蘭,赤芍藥 등이 collagen誘發關節炎에 각각有效하다고報告하였으나利小便,祛風止痛^{13,14)}의作用이 강한木防己에對한報告는接하지 못하였다.

이에著者는木防己와“調和氣血,通調經絡”의效能¹⁵⁾이 있는足三里(S36)^{16,17)}를選擇하여正常생쥐의肺組織細胞(mouse lung fibroblast cell, mLFC)와 류마티스關節炎患者의hFLS(human fibroblast-like synovial)細胞에對한細胞毒性(cytotoxicity)과細胞週期分析(cell cycle arr-est)을遂行하였다.hFLS細胞에서IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 MMP-2轉移酵素遺傳子發現을觀察하였고, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의生産量 및木防己藥鍼에 의한hFLS細胞增殖를測定하였다. 또한

생쥐에 collagen關節炎誘發시킨 뒤發病率,關節炎指標, 뒷다리浮腫,遲延型過敏反應(DTH),脾臟細胞의CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞數 및血清中IL-6, TNF- α 의量을測定하여,有意한結果를 얻었기에報告하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 動物

Charles River (Japan)로 부터 DBA/1J 6週齡 생쥐(體重 30g)를分讓받아實驗에 앞서2週間實驗室環境에適應시킨 후使用하였다.動物飼育室의條件은conventional system으로22 \pm 2 $^{\circ}$ C를維持하고,1日 중12時間은200~300 lux로照明하였고,12時間은모든빛을遮斷하였다.

2) 藥材

實驗에使用된木防己(Stephania tetrandra)^{13,14)}는大田大學校附屬韓方病院에서購入한것을精選하여使用하였다.

3) 藥鍼液의製造

木防己 55g을粗末로하여圓形 flask에 넣고蒸溜水 300ml에各各加하여3時間동안混合恒溫水槽(shaking water bath)에서流出하고濾過한 다음, 이沈澱物을3回濾別(3M paper)한 후減壓濃縮器(rotary evaporator)로減壓濃縮하였다.木防己濃縮液에95% ethyl alcohol 30ml를加하여室溫에서攪拌한 후放置하여生成된沈澱物을濾別하고,濾液을 다시減壓濃縮器로減壓濃縮하여生成된沈澱物을濾別한다.濾液을 다시85% 에탄올 30ml를加하여 잠시攪拌하고放置하여生成된沈澱物을濾別하고 다시濾液을75% 에탄올 30 ml

를 가한 후 같은 操作을 2回 反復한 다음 濾液中 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣 全量을 20g이 되게 하였다. 1N NaOH로 pH 6.8로 調節하여 低溫에서 12時間 放置한 후 微量의 浮遊液을 濾別한 다음 高壓滅菌하여 藥鍼液을 製造한 후 使用時에는 10%와 20%로 稀釋하여 使用하였다.

2. 方法

1) Human synovial 細胞分離 및 細胞에 미치는 影響

(1) 細胞培養

생쥐의 正常 lung fibroblast 細胞 (mLFC)는 생쥐의 肺(lung) 組織을 cool D-PBS로 3回 洗滌한 後 작은 조각으로 切斷한 後 conical tube (15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5分間 遠心分離하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics { (penicillin 10^4 U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培養基에서 2時間 동안 培養한다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 添加한 後 30分間 계속 培養한다. 培養 後 磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS)로 約 2回 1,500rpm에서 遠心分離한 後 DMEM-10% FBS에 1週日동안 培養한다. 1週日 後 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC細胞를 分離하여 DMEM-5% FBS 培養液에 105cells/ml 濃度로 맞추어 96well plate에 分株하였다.

忠南大學校 醫科大學 附屬病院에서 류마티스 關節炎患者의 滑膜組織을 供給 받아 cool D-PBS로 3回 洗滌한 후 작은 조각으로 切斷하여 conical tube (15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5分間 遠心分離 하였다. Tube에 RPMI1640 {containing collagenase A (5mg/ml, Sigma, USA) }와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 10^4 U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B

25 μ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培養器에서 2時間 동안 培養하였고, 0.5% trypsin- 0.2% EDTA를 添加한 후 30分間 계속 培養했다. 培養 후 PBS로 約 2回 1,500rpm에서 遠心分離 한 후 pellet를 RPMI 1640-10% FBS에 1週日 동안 培養하며 3日 間隔으로 培地를 交換하였다. 1週日 後 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 滑膜細胞를 分離하여 RPMI1640-5% FBS 培養液에 105 cells/ml 濃度로 맞추어 24well plate에 分株하였다.

(2) 細胞毒性 (hFLS cell & mLFC cytotoxicity) 測定

細胞毒性 檢査方法은 SRB assay法을 약간 變形하여 實驗에 使用했다. hFLS細胞 그리고 正常 mLFC 細胞는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養基에서 자란 것을 Trysin-EDTA 溶液으로 單一細胞가 되도록 떼어내고, 細胞를 2.0×10^4 個의 細胞를 96well plate에 分株하고 培養基 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 2時間 培養한 후 木防己藥鍼液 (最終濃度 各各 400, 200, 100, 50, 10 및 1 μ g/ml)을 2時間 동안 處理하였다. 培養終了 후에 培養液을 버리고 磷酸緩衝溶液 (PBS)으로 2回 洗滌하였다. 各 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μ l를 加하고 1時間 동안 4 $^{\circ}$ C에 放置하고, 蒸溜水로 5回 洗滌한 다음 well plate를 空氣中에서 乾燥하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 溶液을 100 μ l/well에 加하여 室溫에서 30分間 染色하였다. 그리고 0.1% acetic acid solution으로 約 4~5回 洗滌한 다음, 空氣中에서 乾燥하고 10mM Tris Base로 100 μ l/well로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA) 3.5 speed로 흔들어 5分間 混合하고, ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540nm에서 吸光度를 測定하였다.

(3) Cell Cycle Arrest 測定

hFLS 細胞를 24well plate에 2×10^5 細胞로 各 well에 分株하고, 木防己藥碱液 ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理하고 1時間 後 rIL-6 ($100 \text{U}/\text{ml}$)를 各各의 well에 添加하여 24時間 동안 培養하였다. 培養終了 後 Darzynkiewicz 등⁴⁶⁾의 方法을 약간 變形하여 PI (DNA content) 染色을 遂行하였다. hFLS 細胞는 固定 後 propidium iodide (PI, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$)/RNase ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理한 後 30分間 染色한 後 유세포형광분석기 (flow cytometer, Becton dickinson, USA)로 分析하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램과 Modifit으로 g0+G1, S, g2+M을 産出(%) 하였다.

(4) DNA fragmentation

6 well plate에 RPMI1640 5%FBS 배지로 1.5×10^6 cells/well을 키웠다. 木防己藥碱液은 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 과 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度로 處理하고 1時間 後 rIL-6 ($100 \text{U}/\text{ml}$)를 各 well에 同時處理하여 20時間 培養하였다. 陽性 對照群으로는 Ursonic acid ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理하였다. 培養終了 後 hFLS 細胞를 5分間 12,000rpm에서 遠心分離하고 上層液을 除去 後, ice-cold PBS로 resuspend 하고 5分間 12,000rpm으로 돌려 上層液을 除去하고 pellet을 얻어 $1 \times$ digestion buffer (100mM NaCl 10mM Tris · Cl, pH8.0 25mM EDTA, pH8.0 0.5% (w/v) SDS $0.1 \text{mg}/\text{ml}$ proteinase K)로 1vol re-suspend한 細胞를 50°C 에서 12~18hr shaking incubation했다. Phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)로 10分間 12,000rpm에서 extraction後 上層液을 따서 chloroform으로 back extraction하고, 2vol 100% EtOH로 -20°C 에서 DNA down시켰다. EtOH을 완전히 除去하고 TE로 녹여서 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ RNase-A를 넣고 1hr 37°C 에서 反應시켰다. 2% agarosegel을 만들어 $20 \mu\text{l}/\text{lane}$ 씩 loading했다.

(5) hFLS 細胞의 逆傳寫-重合酵素 連鎖反應 (RT-PCR)

① RNA extraction

hFLS 細胞는 24 well plate에 1×10^6 細胞로 各 well에 分株하고, 木防己藥碱 抽出物 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 MTS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理하고 1時間 後 rIL-6 ($100 \text{U}/\text{ml}$)를 各各의 well에 添加하여 6時間 동안 培養하였다. 培養終了 後 上層液을 除去한 後 RNAzol^B를 利用하여 滑液細胞膜을 터트린 후 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 處理한 $20 \mu\text{l}$ 의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

② 逆傳寫-重合酵素 連鎖反應 (RT-PCR)

逆轉寫 (reverse transcription) 反應은 準備된 total RNA $3 \mu\text{g}$ 을 75°C 에서 5分 동안 變性(denaturation)시키고, 여기에 $2.5 \mu\text{l}$ 10mM dNTPs mix, $1 \mu\text{l}$ random sequence hexanucleotides ($25 \text{pmole}/25 \mu\text{l}$), RNA inhibitor로서 $1 \mu\text{l}$ RNase inhibitor ($20 \text{U}/\mu\text{l}$), $1 \mu\text{l}$ 100 mM DTT, $4.5 \mu\text{l}$ $5 \times$ RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 加한 후 $1 \mu\text{l}$ 의 M-mLV RT ($200 \text{U}/\mu\text{l}$)를 다시 加하고, DEPC 處理된 蒸溜水로서 最終 부피가 $20 \mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 $20 \mu\text{l}$ 의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 遠心沈降하여 37°C 恒溫水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95°C 에서 5分 동안 放置하여 M-mLV RT를 不活性化시킨 후 合成이 完了된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 使用하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 恒溫水槽方式의 Turbo ThermalcyclerTM (Bioneer Co., Korea)을 利用하여 遂行하였다. 反應은 이미 合成된 $3 \mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 使用하

고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-12 (IL-12), 그리고 interferon- γ (IFN- γ)를 증폭하기 위하여 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 추가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균 증류수를 가하고 pre-denaturation: 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation: 95 $^{\circ}$ C, annealing: 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation: 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarosegel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기泳動을 통하여 분석하였다.

(6) ELISA에 의한 cytokine 측정

hFLS細胞를 實驗 3日前에 2次培養 (1 \times 10⁵ cells/ml)하여 12well plate에 2 \times 10⁶ 細胞를 각 well에 分株한 후 牛胎兒血清 缺乏 RPMI-1640 培養液으로 12時間 培養하였다. 木防己藥液 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml), MTS (1 μ g/ml)을 處理하고 1時間 후 rIL-6 (100U/ml)를 各各의 well에 添加하였다. 6時間 後 RPMI-1640 培養液으로 各 well을 洗滌한 後 새로운 培養液과 木防己藥液抽出物 處理하고 72時間 동안 CO₂ 組織培養器에서 培養하였다. 培養終了 後 全體 培養液을 2,000rpm에서 5分間 遠心分離 하여 上層液을 回收, enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) kit (Endogen, USA)로 IL-1 β (R&B system)의 生産量을 測定하였고, IL-6, TNF- α 는 ELISA kit (R&D system)으로 生産量을 測定하였다.

(7) Western blots

① 細胞性 蛋白質 抽出

hFLS 細胞에 木防己藥液 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml), MTS (1 μ g/ml)을 處理 1時間 後 rIL-6 (100 U/ml)을 處理하고 15分間 同時培養한 後 3回 PBS로 細胞를 水洗하였다. 細胞性 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 緩衝液 {Tris-HCl (200mM; pH8.0), 150mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10 μ g/ml leupetin}을 混合한 後 얼음에서 30分間 培養하고 5分間 遠心分離하여 細胞性 lysate를 얻어 Bradford 染色法으로 蛋白質定量하여 50 μ g으로 測定하였다.

② 細胞性 P38의 immunoblotting 分析

細胞性 lysate (50 μ g)를 12% SDS-PAGEgel에 걸고 PDVF membrane에 轉移시켰다. 2% BSA로 2時間 blocking한 後 anti-p38 antibody (22C11, Boehringer Mannheim, Quebec, Canada)를 處理하여 4 $^{\circ}$ C에서 over-night시켰다.

그리고 anti-mouse Ig HRP-conjugated secondary Ab (1:4000, Amersham, Arlington Heights, IL)과 反應시킨 後 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 分析하였다.

(8) 木防己藥液에 의한 hFLS 細胞 增殖抑制

rIL-6 (R&D system)등을 處理한 hFLS 細胞의 增殖抑制度를 測定하기 위하여 96 well plate의 各 well에 2 \times 10⁶ cells씩 添加하고, 木防己藥液 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)과 rIL-6를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37 $^{\circ}$ C에서 96well plate에 72時間 培養 後 MTS 溶液 (MTS 975 μ l, PMS 25 μ l) 50 μ l 處理하고 2時間 培養한 후 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 3分間 shaking하고 ELISA LEADER (molecular

devices, USA)에서 490nm에서 吸光度를 測定한다.

(9) 細胞內 reactive oxygen species (ROS)의 分析

rIL-6 (R&D system)등을 處理한 hFLS細胞內의 ROS를 測定하기 위하여 24 well plate의 各 well에 5×10^5 cells씩 添加하고, 木防己藥碱 抽出物 (100 μ g/ml)과 rIL-6를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37 $^{\circ}$ C에서 48時間 培養하였다. 培養終了 後 DCFH-DA 50 μ M을 處理하고 5分間 培養하고 2回 水洗한 後 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)로 細胞內 螢光 DCF 또는 ROS를 測定하였다.

2) Collagen으로 誘發시킨 생쥐의 關節炎 抑制 效果

(1) Collagen II (CII) 接種과 木防己藥碱 投與
CII를 0.05N acetic acid로 稀釋 液體가 될 때 까지 녹여 2mg/ml를 만들고 Freund's complete adjuvant와 同量으로 混合하여 2ml를 만들어 이 溶液에 녹아 있는 CII의 用量을 1mg/ml로 만들었다.

생쥐 10마리로 하여 對照群, 陽性對照群인 MTX (methotrexate, 1.0mg/kg, i.p) 處理群 및 木防己藥碱群 (10%0.1 ml/animal/d-ay)의 3個 群으로 나누었고, MTX 處理群은 kg당 1.0mg을 CII 1次 (0日), 2次 (21日)에 걸쳐 2回 腹腔에 接種하였고, 木防己藥碱群은 0.2ml 10% 木防己藥碱液을 CII 1次 接種 後 8週 (56日)間 1日 1回씩 26 gauge 1.0ml (綠十字醫療工業(株), 韓國)로 接種하였다.

(2) 取穴

생쥐의 體表上의 털을 除去한 後 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 使用하여 人體의 足三里 (S36)에 相應하는 部位에 取穴하였다.

(3) 關節炎 指標 (Arthritis index)와 發病率 (incidence) 分析

對照群, MTX 處理群 및 木防己藥碱群에서 CIA 誘發程度를 2次 CII 接種 후 부터 1週日 間隔으로 생쥐의 各 4個의 다리에서 測定하여 記錄하였다.

關節炎 指標 分析은 57日째 實驗 終了 後 關節炎 發病率 分析과 같은 方法으로 測定하였다.

關節炎 徵候 및 關節炎 指標 分析은 아래의 基準으로 發病率 (incidence, %)을 決定하였다.

0 = no arthritis

1 = small degree of arthritis

2 = light swelling

3 = medium swelling

4 = severe swelling

5 = severe swelling and non-weight bearing

(4) 뒷다리 浮腫 測定

CII 接種 前과 後에 뒷다리의 浮腫值를 digital thickness gauge (Digimatic indicator IDC543-107FB, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan)로 왼쪽과 오른쪽 같은 部位를 2回 測定한 후 平均值를 使用하였다. 浮腫值는 뒷다리 두께 (paw Th, mm)로 表現하였다.

(5) 遲延型 過敏反應 (Delayed-Type Hypersensitivity reaction) 測定

正常群, 對照群, MTX 處理群 및 木防己藥碱群으로 區分하여 1次 CII 接種 後 56日에 實驗을 終了하고 오른쪽 귀의 두께를 digital thickness-gauge로 測定하고, CII (0.4mg/ml) 25 μ l를 D-PBS에 녹인 후 오른쪽 귀의 皮內에 注射後 24時間에 두께를 測定하였다.

(6) 脾臟 무게의 變化

正常群, 對照群, MTX處理群 및 木防己藥鍼群을 만들어 1次 CII 接種 後 56日에 實驗을 終了한 後 免疫細胞 增進을 觀察하기 爲해 脾臟 무게를 測定 하였다.

(7) CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 細胞數 分析

對照群, MTX處理群 및 木防己藥鍼群을 만들어 各 群에서 分離한 脾臟細胞를 2회 水洗한 後 Histopaque-1077gradient로 遠心分離하여 periph eral blood mononuclear cells (PBMC)를 分離 하였다. PBMC는 4℃에서 免疫螢光染色 (imm unofluorescence staining)을 實施하였고, 各各에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti -CD19를 넣고 30分間 얼음에서 反應시켰다. 染色 이 完了된 細胞들을 0.3ml의 staining buffer (D-PBS, 3% Fetal Bovine Serum, 0.1% Sodium Azide, 20mM HEPES)에 浮游시켜 flow cytometer (Becton Dickinson, USA))를 利用하여 分析한다. 試料 當 20,000개의 細胞에 對하여 list mode로 資料를 聚合하였으며 CellQuest 프로 그램을 利用하여 分析하였다. Data의 分析은 forward scatter (SSC)의 dual parameter를 利用 한 dot plot上에서 全體 脾臟細胞와 small lym phocyte 및 lymphocyte 領域을 區分하여 그 中の CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺의 比率 (%)을 算出하였다.

(8) ELISA에 의한 cytokine 測定

血清中 IL-6는 ELISA로 (Endogen, USA), TNF- α 는 ELISA kit (Pharmingen, USA)으로 分泌量을 測定하였다. 各 抗體가 microwell plate에 coating된 各 well에 3회 washing 緩衝液으로 洗滌한 後 DBA/1J생쥐의 血清을 100 μ l씩 分株하 였다. 1時間 동안 室溫에서 放置한 後 2회 washing 緩衝液으로 洗滌한 다음 antibody Avidin-HRP

conjugated 100 μ l를 處理하고 1時間 室溫에서 放 置한 後 다시 洗滌하였다. TMB 器質을 100 μ l씩 分株하고 暗所에서 30分間 放置한 後 50 μ l의 stop 溶液을 處理한 後 ELISA leader 450nm에서 吸光 度를 測定하였다. 그리고 표준검장선을 利用하여 血 清中 IL-6와 TNF- α 의 生産量을 測定하였다.

(9) 組織檢査

40日 後에 各 群에서 關節을 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8時間 水洗한 다음 포매하였다. 이것을 microtome으로 切片을 만들어 Hematoxylin & Eosin染色을 하였다.

3) 統計 處理

實驗結果는 mean \pm standard error로 記錄하였 다. 有意性 檢證은 Student's t-test를 利用하여 分 析하였다.

III. 성적

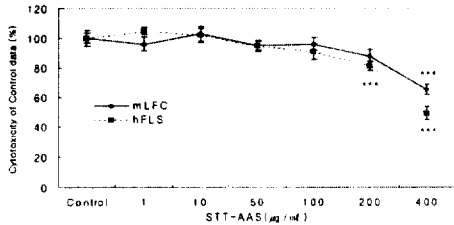
1. 人體 滑膜細胞 分離 및 細胞에 미치는 影響

1) in vitro에서의 細胞毒性

細胞毒性을 觀察한 結果, mLFC에서 對照群의 細胞 生存率 (O.D.값)이 100 \pm 5.4%라고 할 때, 木防 己藥鍼液 (STT-AAS) 1, 10, 50, 100, 200 μ g/ml 處理群에서 각각 96 \pm 4.7, 103 \pm 4.9, 95 \pm 3.2, 96 \pm 4.4, 88 \pm 4.2%로 큰 차이가 없어 細胞毒性을 나 타내지 않았으나 400 μ g/ml 處理群은 65 \pm 3.5% (***)로 細胞毒性을 나타냈다. hFLS에서 對照群의 細胞 生存率 (O.D.값)이 100 \pm 3.4라고 할 때, 木防己藥鍼液 (STT-AAS) 1, 10, 50, 100 μ g /ml 處理群에서 각각 105 \pm 3.4, 102 \pm 4.7, 95 \pm 3.8, 91 \pm 5.5%로 큰 차이가 없어 細胞毒性을 나타

내지 않았으나 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理群은 81 ± 3.1 , $49 \pm 4.5\%$ (** $p < 0.001$)로 細胞毒性을 나타냈다. (Fig. I).

Fig. I. Cytotoxicity effects of *Stephania tetrandra* (STT) Aqua-Acupuncture solution on mLFC (mouse lung fibroblast) and hFLC (human fibroblast-like synoviocytes).

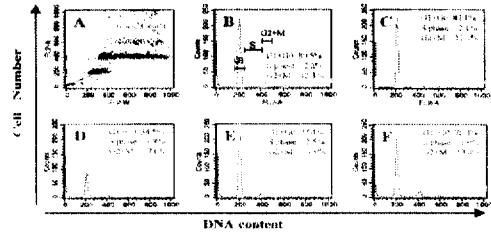


Mouse lung fibroblast cells (mLFC) and human fibroblast-like synoviocytes (hFLS) were pretreated with various concentration STT Aqua-Acupuncture solution (STT-AAS). The results are expressed the mean \pm S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2) hFLS 細胞週期 抑制 分析

B-panel은 正常 hFLS 細胞로 G1+G0 80.5%, S phase 2.2%, G2+M 12.31%이었다. C-panel은 hFLS 細胞에 rIL-6 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理한 hFLS 細胞로 G1+G0 84.1%, S phase 2.1%, G2+M 11.8%이었다. D-panel은 hFLS 細胞에 rIL-6 (100U/ml)와 木防己藥碱液 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 竝行處理한 hFLS 細胞로 G1+G0 34.5%, S phase 1.8%, G2+M이 7.0%이었다. E-panel과 F-panel은 hFLS 細胞에 rIL-6 (100U/ml)와 木防己藥碱液 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 各各 處理한 hFLS 細胞로 各各 G1+G0 77.4%, 76.4%, S phase 2.5%, 1.9%, G2+M 9.9%, 13.4%로 나타냈다 (Fig. II).

Fig. II. Propidium iodide staining of hFLS for cell cycle arrest analysis.

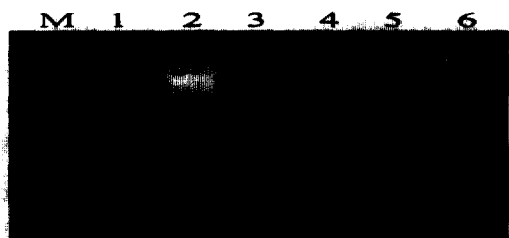


Human fibroblast synoviocytes were pretreated with various concentration STT Aqua-Acupuncture solution (STT-AAS) for 24 hrs and fixed, permeabilized, and stained with 1mg/ml propidium iodide as described in Materials and Methods, and the percentages of cells containing G1+G0, S, G2+M levels of DNA were determined by flow Cytometry and Modifit. A, Events in panel were backscattered onto a dot-plot of FL2-W versus FL2-A. B, Freshly isolated hFLS; C, hFLS pretreated with rIL-6 (100 mg/ml), D, hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (200 mg/ml); E, hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (100 mg/ml). F, hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (10 mg/ml).

3) hFLS에서의 DNA fragmentation

1 lane은 正常 hFLS 細胞이고, 2 lane은 hFLS 細胞에 Ursonic acid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 處理한 hFLS 細胞로 DNA가 斷裂되는 것이 觀察되었고, 3 lane (hFLS 細胞에 rIL-6 (100U/ml)을 處理한 hFLS 細胞, 4 lane (hFLS) 細胞에 rIL-6 (100U/ml)와 木防己藥碱液 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 竝行處理한 hFLS 細胞, 5 lane은 hFLS 細胞에 rIL-6 (100U/ml)와 木防己藥碱液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 竝行處理한 hFLS 細胞, 6 lane은 hFLS 細胞에 rIL-6 (100U/ml)와 木防己藥碱液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 竝行處理한 hFLS 細胞로 DNA fragmentation이 觀察되지 않는 것을 볼 수 있다 (Fig. III).

Fig. III. DNA fragmentation in hFLS following STT-AAS treatment.



Human fibroblast synoviocytes were pretreated with various concentration STT Aqua-Acupuncture solution (STT-AAS) for 20 hrs and cells were lysed and DNA was extracted and electrophoresed on 2% agarose gel, as described in Materials and Methods. Lane M : 1 Hind III marker ; lane 1: Freshly isolated hFLS; lane 2: hFLS pretreated with Ursolic acid (1 mg/ml); lane 3: hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml); lane 4: hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (200 mg/ml); lane 5: hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (100 mg/ml); lane 6: hFLS pretreated with rIL-6 (100 U/ml) plus STT-AAS (10 mg/ml).

4) IL-1β, IL-6, TNF-α 遺傳子 發顯 分析

IL-1β 遺傳子 發顯은 最高值 (Ht)에서 media 群은 40이었고, rIL-6만을 處理한 對照群은 168이였으며, rIL-6과 MTX (1μg/ml) 並行處理한 群은 31이었고, 木防己藥液 並行處理群에서 藥液 100, 10μg/ml 處理群은 各各 52, 124로 木防己藥液 100μg/ml 處理群에서 rIL-6만을 處理한 群보다 抑制效果를 나타내었다 (Table I).

Table I. Inhibitory effects of STT Aqua-Acupuncture solution on pro-inflammatory cytokines m-RNA expression in hFLS.

| Drugs | STT-AAS (μg/ml) | Cytokines m-RNA expression (Ht) | | | |
|------------------|-----------------|---------------------------------|------|-------|-------|
| | | IL-1β | IL-6 | TNF-α | MMP-2 |
| RPMI1640 | 0 | 40 | 28 | 32 | 75 |
| | 0 | 168 | 149 | 135 | 84 |
| rIL-6 (100 U/ml) | MTX (1μg/ml) | 31 | 15 | 14 | 78 |
| | 100 | 52 | 33 | 33 | 81 |
| | 10 | 124 | 82 | 92 | 82 |

Human fibroblast synoviocytes were pretreated with various concentration STT Aqua-Acupuncture solution (STT-AAS) in the presence or absence rIL-6 (100 U/ml) and MTX (1 mg/ml) for 6 h. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Pro-inflammatory cytokines were observed IL-1β, IL-6, TNF-α, m-RNA expression and metastasis gene expression was observed MMP-2 m-RNA expression in hFLS.

遺傳子 發顯은 最高值 (Ht)이 media (RPMI 1640) 群은 28이었고, rIL-6만을 處理한 對照群은 149이였으며, rIL-6과 MTX (1μg/ml) 並行處理한 群은 15이었고, rIL-6와 木防己藥液 並行處理群에서 藥液 100, 10μg/ml 處理群은 各各 33, 82로 나타나 rIL-6만을 處理한 群보다 抑制效果가 있었고, 특히 木防己藥液 100μg/ml 處理群에서 顯著하게 抑制效果를 나타내었다.

傳子 發顯은 最高值 (Ht)이 media 群은 32였고, rIL-6만을 處理한 對照群은 135였고, rIL-6과 MTX (1μg/ml) 並行處理한 群은 14였고, rIL-6와 木防己藥液 並行處理群에서 藥液 100, 10μg/ml 處理群은 各各 33, 92로 나타나 rIL-6만을 處理한 群보다 抑制效果가 있었고, 특히 木防己藥液 100 μg/ml 處理群에서 顯著하게 抑制效果를 나타내었다 .

5) 細胞에서 MMP-2의 遺傳子 發顯

MMP-2 遺傳子 發顯에 있어서 media 群은 75였고, rIL-6만을 處理한 對照群은 84였고, rIL-6과 MTX (1μg/ml) 並行處理한 群은 78였고, rIL-6와 木防己藥液 並行處理群에서 藥液 100, 10μg/ml 處理群은 各各 81, 82로 나타나 rIL-6만을 處理한 群과 類似하여 抑制效果가 보이질 않았다 .

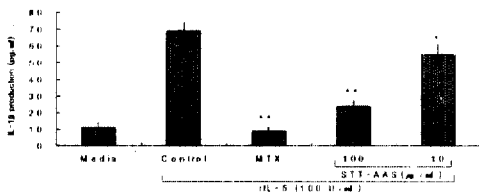
6) IL-1β, IL-6, TNF-α 分泌量에 미치는 影響

(1) IL-1 β 分泌量 分析

hFLS 細胞에서 木防己藥碱液에 의한 IL-6와 IL-1 β , TNF- α 의 分泌量 抑制에 미치는 影響을 알아보기 위하여 hFLS 細胞에 100, 10 μ g/ml 濃度의 木防己藥碱液을 處理하고 72 時間 培養 後 上層液을 얻어 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 ELISA kit 으로 分泌量을 測定하였다.

IL-1 β 의 分泌量은 media 群은 11 \pm 2.8 (pg/ml)였고, rIL-6 (100U/ml)만을 處理한 對照群은 69 \pm 4.8 (pg/ml)로 有意하게 增加하였고, rIL-6과 MTX (1 μ g/ml) 並行處理한 群은 9 \pm 1.9 (pg/ml)였고 (p<0.001), rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群에서 藥碱液 100, 10 μ g/ml 處理群에서 各各 24 \pm 3.4 (p<0.001), 55 \pm 5.8 (pg/ml) (p<0.05)로 나타나 有意性있게 모두 減少하였고, 특히 rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群 100 μ g/ml에서 24 \pm 3.4 (pg/ml)로 顯著하게 減少하였다 (Fig. IV).

Fig. IV. Inhibitory effect of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the IL-1 β production in pro-inflammatory cytokine stimulated hFLS.



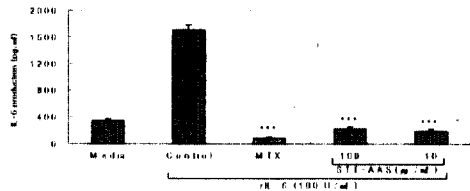
Human fibroblast synoviocytes were pretreated with various concentration STT-AAS in the presence or absence rIL-6 (100 U/ml) and MTX (1 mg/ml) for 6 h. After 6 h, RPMI1640-free washed two repeat and fresh RPMI 1640 media supplemented with 1% FBS. The supernatants were collected after 72 h and IL-1 β concentration in the culture supernatants was assay by ELISA kit. and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. RPMI-1640 media control was not treated, rIL-6 (100 U/ml) was control, rIL-6 + MTX (1 mg/ml), rIL-6 + STT-AAS (100 mg/ml), rIL-6+ STT-AAS (10

mg/ml). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

(2) IL-6 分泌量 分析

IL-6의 分泌量은 media 群은 346 \pm 23.5였고, rIL-6 (100U/ml)만을 處理한 對照群은 1709 \pm 75.4였고, rIL-6과 MTX (1 μ g/ml) 並行處理한 群은 87 \pm 16.8였고 (p<0.001), rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群에서 藥碱液 100, 10 μ g/ml 處理群에서 各各 217 \pm 32.1, 187 \pm 29.7 (pg/ml)로 나타나 有意性있게 모두 減少하였다 (p<0.001) (Fig. V).

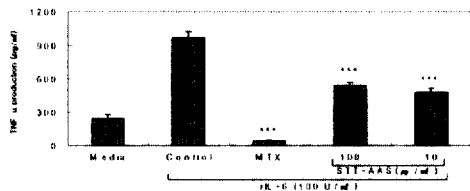
Fig. V. Inhibitory effect of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the IL-6 production in pro-inflammatory cytokine stimulated hFLS.



(3) TNF- α 分泌量 分析

TNF- α 의 分泌量은 media 群은 240 \pm 37.1였고, rIL-6 (100 U/ml)만을 處理한 對照群은 968 \pm 53.1였고, rIL-6과 MTX (1 μ g/ml) 並行處理한 群은 43 \pm 5.8 (pg/ml)였고 (p<0.001), rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群에서 藥碱液 100, 10 μ g/ml 處理群에서 各各 539 \pm 27.4, 479 \pm 35.7 (pg/ml)로 나타나 有意性있게 모두 減少하였다 (p<0.001) (Fig. VI).

Fig. VI. Inhibitory effect of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the TNF- α production in pro-inflammatory cytokine stimulated hFLS.



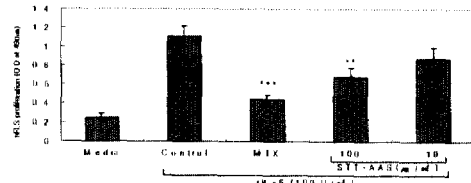
7) 細胞性 P38의 immunoblotting 分析

活性化된 P38 전사인자들은 핵안으로 移動하여 炎症誘發 cytokine 遺傳子 發顯을 일으키게 한다. P38 MAP kinase 活性化는 immune Western blot 分析에 의해 測定된다. P38 MAP kinase의 磷酸화된 形態는 Tyr-20에 western blot analysis에 의해 나타나게 된다. 細胞性 lysate (50 μ g)를 12% SDS-PAGEgel에 걸고 PDVF membrane에 轉移시켰다. 磷酸화된 P38 MAP kinase는 anti-P38 MAP kinase와 anti-phospho-Tyr²⁰ kinase에 分析되었다. hFLS 細胞에 rIL-6 (100 U/ml)을 處理한 對照群에 比하여 hFLS 細胞에 rIL-6 (100 U/ml)와 MTX (1 μ g/ml)을 並行處理한 hFLS 細胞, hFLS 細胞에 rIL-6 (100 U/ml)와 木防己藥碱液 (100 μ g/ml)을 並行處理한 hFLS 細胞에서 顯著的 減少를 보였고, hFLS 細胞에 rIL-6 (100 U/ml)와 木防己藥碱液 (10 μ g/ml)을 並行處理한 hFLS 細胞는 若干의 減少를 보였다.

8) hFLS 細胞의 增殖 抑制

hFLS 細胞의 增殖 抑制를 측정하기 위하여 木防己藥碱液 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)과 rIL-6를 濃度別로 處理한 後 細胞를 72時間 培養 後 MTS 溶液 (50 μ l) 處理하고 2時間 培養한 後 吸光度를 測定한다. Media (RPMI1640) 群은 0.25 \pm 0.04였고, rIL-6 (100U/ml) 만을 處理한 對照群은 1.11 \pm 0.11였고, rIL-6과 MTX (1 μ g/ml) 並行處理한 群은 0.44 \pm 0.05였고 (p<0.001), rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群에서 藥碱液 100, 10 μ g/ml 處理群에서 各各 0.68 \pm 0.09, 0.87 \pm 0.12로 나타나 모두 對照群에 比하여 減少하였으나 rIL-6와 木防己藥碱液 並行處理群 (100 μ g/ml)에서 有意性있게 細胞 增殖를 抑制하였다 (p<0.01)(Fig. VII).

Fig. VII. Inhibitory effect of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the FLS proliferation in hFLS.



9) 細胞內 reactive oxygen species (ROS)의 分析

rIL-6 (100 U/ml)만을 處理한 對照群에 比하여 rIL-6과 MTX (1 μ g/ml) 並行處理한 群과 rIL-6와 木防己藥碱液 (100 μ g/ml) 並行處理群에서 모두 ROS 生産量이 減少됨을 보였다.

2. Collagen으로 誘發시킨 생쥐의 關節炎에 미치는 影響

1) 關節炎의 發病率

對照群, MTX 處理群 및 木防己藥碱群의 data를 2次 CII 接種 후 부터 1週日 間隔으로 DBA/1J 생쥐의 各 4個의 다리에서 測定하여 CIA 誘發 程度를 記錄하였다. 關節炎 指標 分析은 57日째 實驗終了 後 關節炎 發病率 分析과 같은 方法으로 測定하였다.

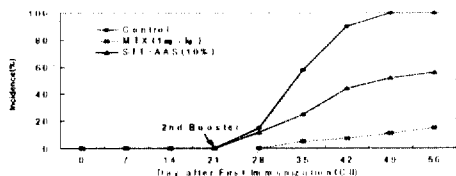
CIA의 發病率에서 對照群은 CII 1차 接種(0日)을 始點으로 2次 booster 接種(21日) 以後부터 關節炎이 發病하기 始作하여 28, 35, 42, 49 및 56日에 15, 58, 90, 100 및 100%로 CIA가 나타나, 21日 以後는 모든 DBA/1J 생쥐에서 觀察되었다.

MTX 處理群은 CII 1次 接種(0日)을 始點으로 28日 以後부터 關節炎이 發病되기 始作하여 35, 42, 49 및 56日에 5, 7, 11 및 15%로 觀察되었다.

木防己藥碱群은 CII 1次 接種 (0日)을 始點으로 21日 以後부터 關節炎이 發病되기 始作하여 28,

35, 42, 49 및 56일에 12, 25, 44, 52 및 56%로 觀察되었다 (Fig. VIII).

Fig. VIII. Prophylactic Effects of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the incidence of Murine CIA



DBA/1J mice were immunized with 100mg of bovine type II collagen (CII) on CIA on days 0 and 21. Group of 10 mice were administered by intradermal injection at the Chok-Samni (S38) with 0.1ml of STT Aqua-Acupuncture solution (10%) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. Incidence (%) was measured observing the severity of Arthritis in the metacarpophalangeal wrist, metatarsophalangeal. Mice showing an AI of 1 or more were considered to have arthritis, and the incidence of CIA was recorded. Each point Represents the mean of 10 mice.

2) 뒷다리 浮腫의 變化

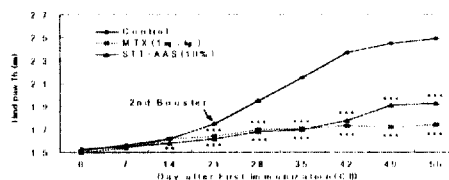
CII 1次 接種(0日)을 始點으로 對照群의 浮腫은 booster 接種 (21日) 以後부터 發生하여 1.75±0.01 mm/21日, 1.95±0.01 mm/28日, 2.15±0.02 mm/35日, 2.37±0.01 mm/42日, 2.45±0.02 mm/49日, 2.49±0.02 mm/56日로 急激히 나타나기 始作하였고 21日 以後에는 모든 생쥐에서 觀察되었다.

MTX 處理群의 浮腫은 1.64±0.01 mm/21日, 1.70±0.01 mm/28日, 1.71±0.02mm/35日, 1.73±0.01 mm/42日, 1.72±0.03 mm/49日, 1.74±0.02 mm/56日로 觀察되어 顯著的 抑制 效果가 있었다 (p<0.001).

木防己藥鍼群의 浮腫은 14日에는 1.58±0.01 mm

(p<0.01), 21日부터 1.62±0.01 mm, 1.68±0.03 mm/28日, 1.70±0.02 mm/35日, 1.78±0.03 mm/42日, 1.91±0.03 mm/49日, 1.93±0.02 mm/56日로 觀察되어 顯著的 抑制 效果가 있었다 (p<0.001) (Fig. IX).

Fig. IX. Prophylactic Effects of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the Hind Paw thickness Th in Murine CIA.



DBA/1J mice were immunized with 100mg of bovine type II collagen (CII) on CIA on days 0 and 21. Group of 10 mice were administered by intradermal injection at the Chok-Samni (S36) with 0.1ml of STT Aqua-Acupuncture solution (10%) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. Hind paw Th was measured using a digital thickness gauge. Each point represents the mean±S.E of 10 mice. Statistically significant value compared with control data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

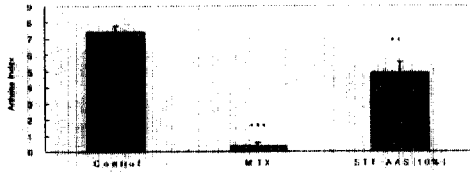
3) 關節炎 指標 (AI)

關節炎 指標 (AI)는 CII 1次 接種(0日)을 始點으로 56日인 實驗終了 後 살펴보았는데 CIA 생쥐의 對照群은 7.4±0.4로 나타났다.

MTX 處理群은 0.32±0.24로 나타나 對照群에 比하여 顯著的 抑制效果를 나타내었다 (p<0.001).

木防己藥鍼群은 4.9±0.65로 나타나 對照群에 比하여 有意性있는 抑制 效果가 있었다 (p<0.01) (Fig. X).

Fig. X. Prophylactic Effects of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the Arthritis index (AI) in Murine CIA.



DBA/1J mice were immunized with 100mg of bovine type II collagen (CII) on CIA on days 0 and 21. Group of 10 mice were administered by intradermal injection at the Chok-Samni (S36) with 0.1ml of STT Aqua-Acupuncture solution (10%) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. The AI was calculated from measurement taken the day after the final drug treatment. Each point represents the mean \pm S.E of 10 mice. Statistically significant value compared with control data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4) 遲延型 過敏反應 (DTH)

正常群은 귀의 두께가 0.01 ± 0.002 mm였고, CII를 免疫한 對照群은 0.29 ± 0.03 mm로 正常群에 比하여 浮腫이 크게 增加하여 CII에 對한 遲延型 過敏反應을 觀察할 수 있었다.

MTX 處理群은 0.13 ± 0.03 mm로 나타나 對照群에 比하여 顯著的 抑制를 나타내었다 ($p < 0.001$).

木防己藥鉞群은 0.20 ± 0.02 mm로 나타나 對照群에 比하여 有意性있게 抑制하였다 ($p < 0.05$) (Fig. XI).

Fig. XI. Prophylactic Effects of STT Aqua-Acupuncture solution and MTX on the Delayed-type hypersensitivity (DTH) skin reaction in Murine CIA.



5) 脾臟 무게

脾臟 무게는 正常群은 131 ± 3.0 mg이었고, CII를 免疫한 對照群은 234 ± 11.0 mg으로 正常群에 比하여 增加하였으며, MTX 處理群 및 木防己藥鉞群 各各 122 ± 9.0 ($p < 0.001$) 및 187 ± 12.0 mg ($p < 0.01$)으로 나타나 두 群 모두 對照群에 比하여 有意한 抑制를 나타내었다.

6) CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 細胞 分析

(1) CD4⁺ 細胞數

脾臟細胞內的 CD4⁺細胞數에서 對照群은 16.2%였고, MTX 處理群은 9.2%로 觀察되었고, 木防己藥鉞群은 14.4%로 나타나 對照群에 比하여 減少되었다.

(2) CD8⁺ 細胞數

脾臟細胞內的 CD8⁺細胞數에서 對照群은 5.37%였고, MTX 處理群은 1.98%로 觀察되었으며, 木防己藥鉞群은 3.20%로 나타나 對照群에 比하여 減少되었다.

(3) CD19⁺ 細胞數

脾臟細胞內的 CD19⁺細胞數에서 對照群은 66.4%였고, 木防己藥鉞群 및 MTX 處理群은 各各 62.5 및 53.5%로 나타나 對照群에 比하여 減少하였다.

7) ELISA에 의한 cytokine 測定

(1) IL-6 分泌量 分析

血清中 IL-6 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)와 TNF- α 는 ELISA kit (Pharmingen, USA)로 分泌量을 測定하였다. IL-6 遺傳子 發顯은 正常群 120 ± 9.5 (pg/ml), 對照群은 3120 ± 579 (pg/ml) 이었고, MTX 處理群은 426 ± 37.8 (pg/ml), 木防己藥鉞液

(10%) 處理群 1341 ± 203 (pg/ml)으로 나타나 모두 對照群에 比하여 IL-6 遺傳子 發顯을 有意性있게 抑制하였다.

(2) TNF- α 分泌量 分析

TNF- α 分泌量은 正常群 47 ± 5.8 (pg/ml), 對照群은 930 ± 45.3 (pg/ml)이었고, MTX 處理群은 342 ± 27.4 (pg/ml), 木防己藥鍼液 (10%) 處理群 523 ± 30.1 (pg/ml)로 나타나 모두 對照群에 比하여 TNF- α 遺傳子發顯을 有意性있게 抑制하였다.

8) 組織檢査

40日 後에 各 群에서 關節을 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 水洗한 다음 microtome으로 切片을 만들어 Hematoxylin & Eosin 染色을 하였다.

正常群(A)은 pannus, synovium, joint space, bone의 構造로 境界가 뚜렷하고, 對照群(B)에서는 invasion synovium, 關節內的 滲出物, 境界面의 破壞, 壞死된 軟骨 그리고 關節軟骨內에 比較的 減少된 proteoglycan 등 境界面이 不分明하게 보였으나 木防己藥鍼處理群(C)은 새로운 bone과 synovium 이 形成되며 正常構造와 類似한 變化를 보였다 (Fig. XII).

IV. 고찰

關節炎은 韓醫學的으로 歷節風^{2-6,18,19-23)}, 鶴膝風^{7,19,25)}, 白虎風^{7,19)}, 白虎歷節風^{7,23-25)}, 痛風^{19,20,23,25-29)}, 痛痺^{7,27)}, 痺痛²⁹⁾, 痺症^{2,5,7,8)}, 風痺^{19-21,23,31)}, 痺證^{29,31)} 등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있다.

治療는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등^{2,12)}의 方法으로 鍼, 艾灸 및 藥物療法, 物理治療, 食餌療法 등이 활용되고 있다. 最近에

Fig. XII. Effect of STT Aqua-Acupuncture solution on the histopathology of joints of Murine CIA.



DBA/1J mice were immunized with 100mg of bovine type II collagen (CII) on CIA on days 0 and 21. Group of 10 mice were administered by intradermal injection at the Chok-Samni (S36) with 0.1ml of STT Aqua-Acupuncture solution (10%) and implanted intraperitoneally (i.p) injected MTX (1mg/kg, i.p) for 56 days beginning on the day after the first immunization CII on CIA, respectively. Mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology as described in Materials and Methods. Cross-sections of the Hindpaw from a Murine CIA. Normal wild-type DBA/1J mouse (A), control; murine CIA (B), STT Aqua-Acupuncture solution (C) on the Chok-Samni (S36) were analysis with histopathology of joints of Murine CIA. Intraarticular exudate, marginal erosion, necrotic chondrocytes, and relative loss proteoglycans in the articular cartilage are present panel (B and C). B, bone; CPJ, cartilage pannus junction; P, pannus; S, synovium; NB, new bone; IP, invasion pannus; JS, joint space, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: X 40.

는 藥鍼療法이 좋은 效果를 나타내고 있음이 報告되고 있으며, 鍼治療에 多用되는 經穴은 足三里, 環跳, 合谷, 膝關, 委中, 肩髃, 絕骨, 天井 등 이 있었고, 本實驗에서 使用한 足三里 (S36)¹³⁻¹⁷⁾는 足陽明胃經의 合土穴이고 六腑下合穴, 回陽九鍼穴, 四總穴, 中風七處穴 중의 하나이며¹⁵⁾, 이 穴의 效能은 “調和氣血, 通調經絡¹⁵⁾하여 胃腸疾患 및 全身疾患 外에도 膝關節痛, 下肢麻痺, 下肢風濕痛 등¹⁵⁾의 下肢疾患에 應用되어 왔다.

防己는 防己科 (Menispermaceae)에 屬한 多年生 蔓草인 덩굴이덩굴의 根^{13,14)}으로, 性이 平·寒無毒^{13,14)}하고, 味는 苦·辛^{13,14,19,20)}하며, 脾^{13,14)}·腎¹³⁾·膀胱經¹³⁻¹⁵⁾에 入하고, 效能은 利小便¹³⁾, 通腠理¹³⁾, 消水腫¹³⁾, 散癰腫^{13,19)}하여, 風寒溫瘧^{13,19)}, 瀉下焦血分蒸熱¹³⁾, 中風手脚攣急¹³⁾ 등에 活用하며 漢防己 (Stephania hernandifolia walpa)는 利水消腫의 作用이 比較的 強하고 木防己 (Cocculus trilobus De Candolle)는 祛風止痛의 作用이 強하므로^{13,14)} 臨牀적으로 關節炎에는 木防己를 使用한다.

藥鍼療法은 穴位注射療法, 水鍼療法이라고 하며 經絡學說의 原理에 依據하여 有關한 穴位나 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 精製된 各種藥物을 注入하여 刺鍼效果와 藥物의 藥理作用을 통하여 生體의 機能을 調整하고 疾病의 治療效果를 높이는 新鍼療法이다.¹³⁾

이에 著者는 足三里(S36)에 木防己藥鍼하여 關節炎 治療에 미치는 影響을 實驗적으로 究明하고자 류마티스 關節炎 患者로부터 hFLS (human fibroblast-like synovial) 細胞를 分離하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 MMP-2 轉移酵素의 遺傳子 發顯을 RT-PCR로 觀察하였으며 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 生産量을 알아보기 위하여 ELISA kit을 使用하였다. 류마티스 關節炎과 類似하다고 報告된 Collagen II를 利用하여 誘發시킨 생쥐에서 關節炎의 發病率 및 關節炎 指標, 뒷다리 浮腫, 遲延型 過敏反應을 測定하였고, 脾臟細胞의 免疫細胞에 미치

는 影響을 觀察하기 위하여 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 등의 細胞數를 測定하였으며 血清中 IL-6, TNF- α 의 量을 測定하였다.

大部分의 eukaryotic cell은 細胞內部的 時計에 따라 生活하는데 이것을 細胞週期라고 한다. 細胞週期는 크게 DNA가 複製되는 合成段階 (S : synthesis phase)와 細胞가 두 개로 나뉘는 體細胞 分裂段階 (M : mitotic phase)로 나뉘며 이러한 細胞週期는 細胞內 DNA의 量, 細胞外部의 營養의 有無 등에 의해 調節된다. C-panel은 G1+G0와 S phase의 stage 細胞가 G2+M으로 活性化된 것으로 생각된다. D-panel은 G2+M와 S phase의 stage 細胞는 變化가 없었고, G1+G0 stage의 細胞들이 木防己藥鍼液에 의하여 apoptotic 細胞로 轉換된 것으로 생각된다. E-panel과 F-panel은 木防己藥鍼液에 의한 apoptotic 細胞로 轉換이 일어나지 않는 것으로 생각된다.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 代表的인 炎症誘發 cytokine으로 synovial 細胞에서 過剩으로 生産되어 synovial 細胞의 增殖을 促進하는 것으로 알려졌다. 다른 proinflammatory cytokines은 TNF- α 가 無力해지면 抑制되어진다는 것으로 proinflammatory cytokines의 network가 TNF- α 에 연결되어 있다는 새로운 假說이 定立되었으며 이러한 假說은 TNF- α 가 RA에 있어서 治療의 目標가 된다는 것을 알 수 있게 하였다.

本實驗에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 遺傳子 發顯은 rIL-6를 處理하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 過剩生産을 誘導할 수 있었고, 陽性對照群 MTX (1 μ g/ml)을 處理하여 proinflammatory cytokine을 顯著히 抑制시켰고, γ IL-6와 木防己藥鍼液을 並行處理한 郡은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 遺傳子 發顯을 顯著히 抑制시켜 木防己의 RA에 對한 治療可能性을 알 수 있었다.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 分泌量은 MTX 處理群, 木防己藥鍼群에서 有意性있게 모두 減少하여

mRNA 遺傳子 分析과 一致하였다.

Matrix metalloproteinase는 癌細胞와 synovial 細胞가 生體內에서 extracellular matrix protein에 作用하여 invasion을 하는데 重要的 役割을 하는 것으로 알려진 轉移 및 浸透誘發酵素인데, Ext-racellular matrix의 減少는 rheumatoid 關節 破壞에 重要的 役割을 한다. Rheumatoid synovial fibroblast는 많은 MMPs를 分泌하고, rheumatoid synovial fibroblast에 있어서 cytokine은 潛在的인 MMPs의 誘發因子로 알려져있다. Migita는 fibroblast의 TNF- α 의 刺戟은 MT-MMP를 活性化된 形態로 分泌하며 MT-MMP를 誘發하는 TNF- α 刺戟은 synovial fibroblast에 있어서 MMP-2의 特異的 活性因子로 證明되었으며 cytokine-mediated에 대한 새로운 機轉은 RA에 있어서 關節 破壞를 代表的으로 나타내었다. 本 實驗에서는 MMP-2 遺傳子 發顯이 rIL-6만을 處理한 對照群과 類似한 것으로 보아 木防己 藥碱이 MMP-2의 遺傳子 發顯을 抑制하지 않았다.

本 實驗에서는 proinflammatory cytokine의 細胞信號傳達經路인 MAPk 經路를 확인한 結果 對照群에 比하여 rIL-6 (100 U/ml)와 木防己藥碱液을 並行處理한 hFLS 細胞에서 P-38 MAP kinase가 顯著的 減少를 보여 木防己 藥碱이 P-38 MAP kinase의 信號傳達를 遮斷하여 IL- β , IL-6, TNF- α 의 遺傳子 發顯을 抑制한 것으로 思慮된다.

ROS는 carcinogenesis, atherosclerosis, inflammatory disorders와 같은 多樣的 疾病의 病因으로 RA의 感染과 免疫學的인 과정에 있어서 基本的인 役割을 한다.

本 實驗에서는 對照群에 比하여 rIL-6 (100 U/ml)와 木防己藥碱液 (100 μ g/ml)을 並行處理한 hFLS 細胞에서 減少를 보여 木防己 藥碱이 ROS 生成을 抑制하는 것으로 思慮된다.

CIA 생쥐의 關節炎에 미치는 影響은 關節炎의 發病率에 있어서 木防己藥碱群은 CII 1次 接種 0日을

始點으로 21日 以後부터 關節炎이 發病되기 始作하여 對照群에 比하여 적게 觀察되었다. 이는 木防己의 利小便, 通膜理의 效能¹⁴⁾이 關節炎의 發病을 抑制하는 것으로 思慮된다.

뒷다리 浮腫의 變化는 CII 1次 接種 0日을 始點으로 對照群의 浮腫은 booster 接種 (21日) 以後부터 모든 생쥐에서 觀察되었다. MTX 處理群과 木防己藥碱群의 浮腫은 顯著的 抑制 效果가 있었다. 이는 木防己의 消水腫의 效能¹⁴⁾이 浮腫을 抑制하는 것으로 思慮된다.

關節炎 指標 (AI)는 CII 1次 接種 後 56日에 實驗終了 直後까지 살펴보았는데 CIA 생쥐의 MTX 處理群 (p<0.001)과 木防己藥碱群 (p<0.01)은 對照群에 比하여 有意性있는 抑制 效果가 있었다.

遲延型 過敏反應 (DTH)은 IV형 알레르기에 屬하며, 抗原으로 Th1淋巴球와 同一한 抗原으로 再次 刺戟되어 IFN- γ 를 生成하고, 이것에 의해 活性化되는 大食細胞의 作用이 中心이 되는 炎症性 組織 傷害 反應이다. CII를 免疫한 對照群은 正常群에 比하여 浮腫이 크게 增加하여 CII에 對한 遲延型 過敏反應을 觀察할 수 있었고, MTX 處理群과 木防己藥碱群은 對照群에 比하여 有意性있게 抑制하였다.

脾臟 무게는 CII를 免疫한 對照群은 正常群에 比하여 增加하였고, MTX 處理群 (p<0.001) 및 木防己藥碱群 (p<0.01) 두 群 모두 對照群에 比하여 有意한 減少를 나타내었다.

CD4⁺ 細胞는 抗原을 B淋巴球에 傳達하여 抗體生成을 誘發시키는 機能이 있다고 報告되고 있고, 脾臟細胞內的 CD4⁺ 細胞數는 MTX處理群, 木防己藥碱群 두 群 모두 對照群에 比하여 減少되었고, CD8⁺ 細胞는 癌細胞와 같은 非正常的인 細胞를 直接 除去할 수 있는 機能이 있는 것으로 報告되고 있으며 CD8⁺ 細胞數에서 MTX 處理群, 木防己藥碱群 모두 對照群에 比하여 減少되었다. CD19⁺ 細胞數에서는 木防己藥碱群 및 MTX 處理群은 對照群에 比하여 減少하였다.

ELISA에 의한 cytokine을測定한結果 IL-6, TNF- α 分泌量은 MTX 處理群, 木防己藥鍼液(10%) 處理群 모두 對照群에 比하여 有意性있게 抑制되었다.

組織檢査에서 正常群은 pannus, synovium, joint space, bone의 構造로 境界가 뚜렷하고, 對照群에서는 invasion pannus, 關節內의 滲出物, 境界面의 破壞, 壞死된 軟骨 그리고 關節軟骨內에 比較的 減少된 proteoglycan 등 境界面이 뚜렷하지 않았으나 木防己藥鍼群은 새로운 bone과 synovium이 形成되고 새로운 境界面이 形成되어 正常構造와 類似한 變化를 보였다.

以上을 綜合하여 볼 때 木防己藥鍼液은 hFLS 細胞에서 發顯되는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 遺傳子 發顯과 生産量을 抑制함으로써 hFLS 細胞의 增殖抑制와 關聯이 있었고, P38 MAP kinase의 信號傳達를 遮斷하여 IL- β , IL-6, TNF- α 의 遺傳子 發顯을 抑制하였으며 ROS의 生成을 抑制하였다. CIA 생쥐에서 足三里에 木防己藥鍼液이 關節炎을 抑制하는 것을 觀察할 수 있었고, 脾臟細胞內의 木防己藥鍼液을 處理하여 CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞, CD19⁺ 細胞數가 減少되었으며 IL-6, TNF- α 生産量을 減少하였다. 이는 木防己藥鍼이 류마티스 關節炎 治療에 有效한 것을 立證한 것으로, 向後 臨床에서 많이 活用할 수 있을 것으로 期待된다.

V. 결론

足三里 (S36)에 木防己藥鍼이 關節炎에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 正常 생쥐의 肺組織細胞(mLFC)와 류마티스 關節炎 患者의 hFLS 細胞에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 MMP-2 轉移酵素 遺傳子發顯을 觀察하였고, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 生産量, hFLS 細胞 增殖 및 P-38 MAP kinase,

ROS의 生成을 測定하였으며 또한 CIA 생쥐의 發病率, 關節炎 指標, 뒷다리 浮腫, 遲延型 過敏反應(DTH), 脾臟細胞의 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 細胞數 및 血清中 IL-6, TNF- α 의 量을 測定하여 關節炎 抑制에 有意한 結果를 아래와 같이 얻었다.

1. hFLS 細胞의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 遺傳子 發顯은 實驗群에서 顯著히 抑制되었으나 MMP-2 遺傳子 發顯은 抑制效果가 없었다.
2. IL-1 β , IL-6, TNF- α 分泌量은 實驗群에서 顯著히 抑制되었다.
3. hFLS 細胞에서 實驗群은 P-38 MAP kinase, ROS의 生成을 抑制하였다.
4. 實驗群은 CIA 생쥐의 關節炎 發病率, 뒷다리 浮腫, 關節炎 指標, 遲延型 過敏反應을 有意性있게 抑制하였다.
5. 實驗群은 CIA 생쥐에서 脾臟 무게를 有意性있게 減少시켰고, 脾臟細胞內의 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ 細胞數를 減少시켰으며 IL-6, TNF- α 分泌量을 有意性있게 減少시켰다.
6. 實驗群은 組織檢査에서 對照群에 比하여 새로운 bone과 synovium의 形成이 促進되었고 境界面이 鮮明해졌다.

VI. 참고문헌

1. 崔述貴. 實用鍼灸內科學. 서울:醫聖堂, 1993: 405-12, 584-90.
2. 權宰植. 痺證. 서울:鼎談, 1993:207-8, 214

- 5, 219-22, 270.
3. 金定濟. 診療要鑑. 서울:東洋醫學研究所. 1974: 459-460.
4. 朴柄昆. 增補韓方臨床40年. 서울:大光文化社. 1989:343.
5. 裴元植. 最新韓方臨床學. 서울:南山堂. 1989: 446.
6. 崔容泰. 精解鍼灸學. 서울:杏林書院. 1974:184, 248, 166-74, 279-82, 615-7.
7. 李用粹. 證治彙補. 台北:旋風出版社. 1976: 198-206.
8. 王清任. 醫林改錯. 台北:台聯國風出版社. 1975: 65.
9. 上海中醫學院. 內科學(上). 上海:上海科學技術出版社. 1983:234-8.
10. 生藥學研究會. 現代生藥學. 서울:학창사. 1992: 455-8.
11. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1986:554-69.
12. 白洪龍. 常見病症辨症診治概要. 雲南省:雲南人民衛生出版社. 1984:382-5.
13. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林出版社. 1986: 604-5.
14. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1987:522.
15. 崔容泰. 鍼灸學(上,下). 서울:集文堂. 1988: 382-4, 1272, 1297-8, 1457.
16. 鄭魁山. 鍼灸集錦. 甘肅省:甘肅科學技術出版社. 1988:54-5.
17. 中醫研究院. 鍼灸學簡編. 北京:人民衛生出版社. 1989:373-4.
18. 楊緒性. 中醫痛症診療大全. 北京:中國中醫藥出版社. 1992:619-43.
19. 李挺. 編註醫學入門. 서울:大星文化社. 1989: 369-71, 523.
20. 張介賓. 景岳全書. 北京:人民衛生出版社. 1991: 248-55.
21. 巢元方. 諸病源候論. 北京:人民衛生出版社. 1982:5-8.
22. 王燾. 外臺秘要方. 서울:大星文化社. 1983: 424.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1987:370-8.
24. 程國彭. 醫學心悟. 香港:友聯出版社. 1961: 171-4.
25. 虞搏. 醫學正傳. 北京:人民衛生出版社. 1981: 212-8.
26. 龔廷賢. 萬病回春. 北京:人民衛生出版社. 1972: 309.
27. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:大星文化社. 1983: 480-1.
28. 高武. 鍼灸聚英. 上海:上海科學技術出版社. 1978:32-3, 175.
29. 唐容川. 血證論. 台北:力行書局有限公司. 1984: 168.
30. 張仲景. 仲景全書. 서울:大星文化社. 1984: 366-9.
31. 劉鵬舉, 孫校, 夏洪生. 中醫臨證指南. 長春:吉林科學技術出版社. 1991:203-5.
32. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 台北:台聯國風出版社. 1984:95-6, 328-36.
33. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北:東方書店. 1950: 30-9.
34. 陳無擇. 三因方. 大連:國風出版社. 1977:2-3.
35. 林準圭. 東醫物理療法科學. 서울:高文社. 1990: 270.
36. 安榮基. 經穴學叢書. 서울:成輔社. 1986:196.
37. 康秉秀. 本草學. 서울:永林社. 1991:263-4.
38. 胡洋吉. 神農本草經備要. 臺北:文筆書局. 1985: 127.
39. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982: 1313-4.