

원저

봉독약침이 제2형 콜라겐유도 관절염에 미치는 영향

김태우 · 최도영 · 이재동

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The effect of Bee Venom on type II Collagen-induced Arthritis

Tae-Woo, Kim · Do-Young, Choi · Jae-Dong, Lee

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine in
Kyung-Hee University

Objective : Bee venom (BV) has traditionally been used in Oriental medicine to relieve pain and to treat inflammatory disease such as rheumatoid arthritis (RA). Autoimmunity to type II collagen (CII) may involve in the pathogenesis of RA. This study was performed to evaluate the effect of BV on type II collagen induced arthritis (CIA) with the naked eye, a immunohistochemical method and the examination of histology.

Method : Male mice were immunized by subcutaneously injection of an 200 μ g emulsion mixed with bovine CII and complete Freund's adjuvant (CFA) twice for two weeks. In the control group, normal saline was injected, and in the experimental group, BV was applied.

Result : The incidence of arthritis, the mean arthritis index and the number of the arthritic limbs of the BV group were all significantly lower than those of the control group. Among the pro-inflammatory cytokines, the production of TNF- α in the BV group was also suppressed compared with the control group, but IL-1 β was not. The examination on the histopathology of joints of CIA mice showed the effect of Bee Venom Herbal Acupuncture on the arthritis.

Conclusion : Treatment with BV resulted in inhibition of development of arthritis and immune responses to CII.

Key words : bee venom (BV), rheumatoid arthritis (RA), type II collagen (CII), TNF- α , IL-1 β

- 접수 : 2002년 2월 1일 · 수정 : 3월 2일 · 채택 : 2002년 3월 19일
· 교신저자 : 김태우, 서울특별시 마포구 합정동 363-14 해당한방병원(Tel. 02-337-8428)
E-mail : haedang@lycos.co.kr

I. 서론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis; RA)은 대표적인 자가면역성 질환이며 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로, 연골과 골 파괴로 인해 관절의 파괴와 변형을 초래한다¹⁾. 서구의 경우 환자 1인당 연간 약 2,000달러의 비용을 부담시킬 뿐 아니라 실제로 환자의 수명도 단축시킬 수 있는 질환이므로, 노령층이 많아지는 현대 사회에서의 중요한 사회적 문제를 지니고 있는 질병이다²⁾.

류마티스 관절염의 치료로는 현재 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs), 부신피질호르몬제, 항류마티스 약물(DMARDs), 세포독성제, 면역억제제 등 다양한 약제들이 사용되고 있으나¹⁾, 약물 복용의 부작용으로 우울증, 위장관의 궤양 유발, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 야기하고 있어³⁾ 더 안전하고 효과적인 치료 방법이 필요할 것으로 사려되며, 현재 임상에서 관절염 치료에 활용되고 있는 봉독약침 등이 이에 해당될 수 있을 것으로 기대된다.

봉독이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 약 40여 가지의 유효성분으로 구성된 물질로⁴⁾ 기원전부터 인체의 질병치료에 이용되어 왔고⁵⁾, 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 효능이 있으며, 국내외 연구동향을 살펴보면, 국내에서는 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin의 항암효과⁴⁾ 등 진통, 소염, 鎮痙, 항암효과, 면역기능 증강작용 등이 보고되었고⁴⁾, 외국에서도 봉독 구성 성분의 작용과 기전, 봉독의 과민성과 독성, 단순포진, 다발성 경화증, 종양, 면역요법 및 관절염 등의 질병치료 등에 관한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다.

관절염에 대한 봉독약침의 연구로는 왕⁶⁾등의 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적

연구, 권⁷⁾등의 슬관절의 퇴행성 관절염에 대한 진통효과: 단순 침치료와의 비교연구, 황⁸⁾등의 봉독약침을 이용한 류마티스 관절염의 임상적 연구 등이 있다.

실험적으로는 권⁹⁾등의 Mycobacterium butyrificum을 유발원으로 이용한 관절염에 대한 치료효과를 입증한 연구, 김¹⁰⁾, 권¹¹⁾등의 Carrageenin을 유발원으로 이용한 항염증과 진통에 관한 연구 등이 있으나, 이는 급성 관절염 실험모델이고, 만성 관절염 실험모델에 대한 연구는 부족한 실정이다.

만성 관절염 실험모델로는 관절의 주요 구성성분인 제2형 콜라겐(type II collagen; CII)을 이용한 실험모델이 잘 알려져 있는데¹²⁾, 이를 DBA/1 마우스에 주사하면 류마티스 관절염과 유사한 관절염(Collagen Induced Arthritis; CIA)이 유발된다^{13,14)}.

이에 본 연구에서는 RA와 유사한 만성 관절염 유형을 보이는 제2형 콜라겐 유도 관절염 실험모델에서, 調和氣血, 通調經絡의 穴性을 가지며 관절염에 많이 활용되는 족삼리(ST36)¹⁵⁾에 봉독약침을 처치한 후, 관절염의 임상적 변화(관절염 발생률, 평균 관절염 지수, 관절염이 생긴 평균 다리 수)와 면역관련인자 중 TNF- α 와 IL-1 β 의 측정 및 조직검사를 하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 동물

주령이 8~12주(약 20~25gm)의 DBA/1 mice (Jackson Lab, Westgrove, PN)를 대상으로 하였으며 성별에 따른 오차를 줄이기 위해 교배 및 양산 후 수컷 쥐만 선정하였다. 실험동물의 양육과 증산은 모두 specific pathogen free (SPF) 조건(22 \pm 1 $^{\circ}$ C 항온, 55% \pm 5% 항습, hepafiltered air

공급)에서 시행하여 외부 항원의 감염에 의한 영향을 최소화시켰다.

2. 재료

봉독은 microchip을 이용한 전자기 발생장치로 꿀벌의 봉낭을 자극하여 채취한 다음, 가공한 꿀벌의 건조봉독을 생리식염수 99.9ml에 봉독 0.1g을 희석하여 0.1% 봉독을 얻은 후 다시 생리식염수에 희석하여 0.025% (1mg/4ml) 봉독을 만들어 사용하였다.

3. 방법

1) 항원제조와 콜라겐 유도 관절염(Collagen induced arthritis ; CIA) 유발

Andrew H Kang (University of Tennessee, Memphis, TN)으로부터 기증받은 동결 건조된 우형 제2형 콜라겐 (native Bovine type II collagen; BnCII)을 10mM acetic acid에 4 mg/ml의 농도로 녹인 후 4℃에서 12시간 이상 교반하였다. BnCII와 4mg/ml의 complete Freund adjuvant (CFA) (Difco, Detroit, MA)를 1:1로 섞은 후 균질기 (homogenizer)를 이용하여 1000rpm의 속도로 30분간 혼합하였다. CIA의 유발을 위해 BnCII와 CFA 혼합액 50 μ l (CII 100 μ g + CFA 100 μ g)를 26G 주사바늘과 3way가 부착된 주사기를 이용하여 쥐의 꼬리에 피내주사 하였다. 1차 접종 후 2주 후에 BnCII와 CFA 혼합액을 10mM acetic acid에 1:1로 희석한 후 50 μ l (BnCII 50 μ g + CFA 50 μ g)를 발바닥에 추가 접종하여 CIA를 유발시켰다(Figure 1).

2) 실험군 설정 및 봉독 처치

마우스 10마리를 1 군으로 하여 대조군 및 봉독 약침군으로 나누어 관절염을 유발한 후, 대조군은 생리식염수 0.1ml를, 봉독약침군은 봉독약침액 0.1

ml를 양측 족삼리(ST36)에 약침자극하였다(Figure 1).

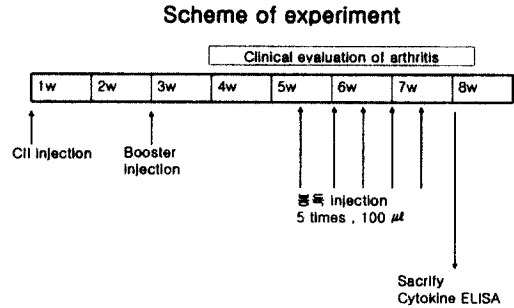


Figure 1. Scheme of experiment

3) 관절염의 임상적 관찰과 평가

관절염의 발생유무와 정도는 부종과 발적의 유무 및 정도로서 평가하였다. 관절염의 관찰은 실험군과 대조군을 인지하고 있지 않은 2명의 관찰자가 수행하여 관찰자에 따른 오차를 최소화시켰다. 1차 주사 후 3주까지는 주 1회, 3주부터는 주 3회의 빈도로 관찰하고 관찰 시기마다 관절염의 중증도를 기록하여 아래와 같은 방법에 따라 점수화하였다.

중증도 0 (Gr 0) : 부종이나 종창이 없는 경우

중증도 1 (Gr I) : 족근골(mid foot 혹은 tarsal bone)이나 발목 관절에 국한된 경한 부종과 발적
중증도 2 (Gr II) : 발목 관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적

중증도 3 (Gr III) : 발목 관절에서 중족골(metatarsal bone)에 걸친 중증도 부종과 발적

중증도 4 (Gr IV) : 발목에서 발가락 전체에 걸친 부종과 발적

중증도 평가 결과를 기초로 하여 관절염의 발생률(Arthritis incidence, %), 평균 관절염 지수(Mean arthritis index), 관절염이 생긴 평균 다리 수(Number of arthritic limb, %)를 아래와 같은

방법으로 구하였다.

Arthritis incidence (%) = (number of mice with Gr II or more / total number of mice) × 100

Mean arthritis index = sum of arthritic severity of each leg of total mice / total number of mice

Number of arthritic limb (%) = (number of limbs with Gr II or more / total number of the limbs) × 100

4) 쥐의 혈청에서 proinflammatory cytokine의 측정

콜라겐 유도 관절염(CIA)은 전신적인 면역 반응에 의해서 나타나는 결과로 관절염 발생시에 염증 매개 cytokine의 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 이들은 TNF- α , IL-1 β 등으로 이들에 의해 관절염과 그로 인한 bony changes가 오는 것으로 설명되고 있다. CIA 실험동물의 혈청을 분리하여 이 혈청으로부터 TNF- α , IL-1 β 를 ELISA법으로 측정하였다. 혈청은 분리 후 측정시까지 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

5) 조직검사

고정액에 고정된 족지관절을 dehydration 시킨 후 파라핀을 침투시켜 굳혔다. 5 micron으로 박절하여 silicone으로 coating된 슬라이드에 붙였다. 염색을 하기 위해 슬라이드를 수화시킨 후 hematoxyline과 eosin 염색을 순서대로 시행하였다. 염색된 슬라이드를 dehydration 시킨 후 mounting하여 morphology를 관찰하였다.

6) 통계처리

통계분석은 Mann-Whitney U-test를 사용하였으며, 통계처리는 SPSS $^{\circledR}$ 8.0 for windows를 사용하였다. 유의성 판정은 P 값이 5% 미만으로 하였다.

III. 결과

1. 관절염 발생률 (Arthritis Incidence)

대조군에서는 7주 째와 8주 째 모두 100%의 발생률을 나타내었으며, 봉독약침군에서는 7주 째 63.15%와 8주 째 31.57%의 발생률을 나타내어, 8주 째 유의성(p<0.05) 있는 감소를 보였다(Table 1, Fig. 2).

Table 1. Arthritis Incidence of CIA mice (%)

Group	After 1st BnCII injection			
	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks
AC	62.50	87.50	100	100
BV	36.84	70.00	63.15	31.57*

BnCII : native Bovine type II Collagen

AC : group of normal saline aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

BV : group of bee venom aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

*p<0.05 : statistical difference between normal saline group and BV group

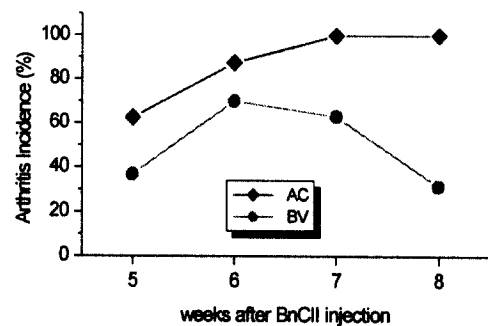


Figure 2. Arthritis Incidence of CIA mice

2. 평균 관절염 지수(Mean Arthritis Index)

대조군에서는 8주 째 8.25의 평균 관절염 지수를

나타내었으며, 봉독약침군에서는 8주 째 3.39의 평균 관절염 지수를 나타내어, 8주 째 유의성 ($p<0.05$) 있는 감소를 보였다(Table 2, Fig. 3).

Table 2. Mean Arthritis Index of CIA mice

Group	After 1st BnCII injection			
	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks
AC	4.00	5.38	8.50	8.25
BV	1.50	2.00	6.20	3.39*

BnCII : native Bovine type II Collagen

AC : group of normal saline aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

BV : group of bee venom aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

* $p<0.05$: statistical difference between normal saline group and BV group

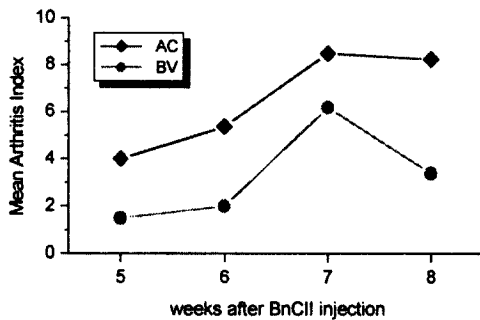


Figure 3. Mean Arthritis Index of CIA mice

3. 관절염이 생긴 평균 다리 수(Number of Arthritic Limb)

대조군에서는 7주 째 87.50%, 8주 째 75.00%를 나타내었으며, 봉독약침군에서는 7주 째 40.25%, 8주 째 26.62%를 나타내어, 7주 째부터 유의성 ($p<0.05$) 있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4).

Table 3. Number of Arthritic limb of CIA mice (%)

Group	After 1st BnCII injection			
	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks
AC	25.00	34.30	87.50	75.00
BV	12.50	37.50	40.25*	26.62*

BnCII : native Bovine type II Collagen

AC : group of normal saline aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

BV : group of bee venom aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

* $p<0.05$: statistical difference between normal saline group and BV group

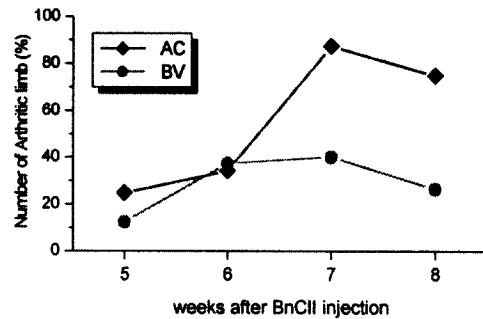


Figure 4. Number of Arthritic limb of CIA mice

4. Pro-inflammatory Cytokine : TNF- α

대조군에서는 99.52 ± 6.50 pg/ml였으며, 봉독약침군에서는 59.79 ± 4.49 pg/ml를 나타내어, 유의성 ($p<0.05$) 있는 감소를 보였다(Table 4, Fig. 5).

Table 4. The production of Pro-inflammatory Cytokine (TNF- α) from serum of CIA mice

Group	Pro-inflammatory Cytokine (pg/ml)
	TNF- α
AC	99.52 ± 6.50
BV	$59.79 \pm 4.49^*$

Data are mean \pm standard deviation of average.

AC : group of normal saline aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

BV : group of bee venom aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

*p<0.05 : statistical difference between normal saline group and BV group

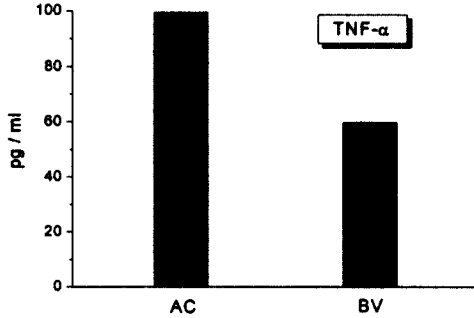


Figure 5. The production of Pro-inflammatory Cytokine (TNF-α) from serum of CIA mice

5. Pro-inflammatory Cytokine : IL-1β

대조군에서는 26.38±5.41 pg/ml였으며, 봉독약 침군에서는 32.27±4.49 pg/ml를 나타내어, 유의성이 없었다(Table 5, Fig. 6).

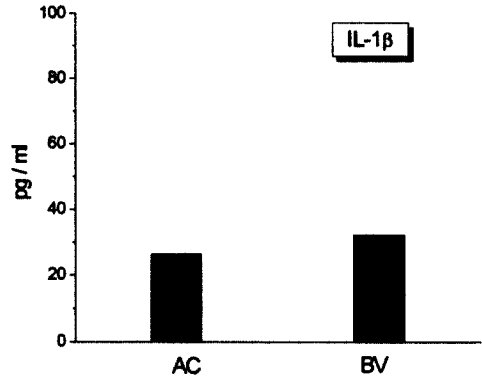


Figure 6. The production of Pro-inflammatory Cytokine (IL-1β) from serum of CIA mice

6. 조직검사

관절염이 유발된 족지관절을 절편하여 염색한 후 활막부위를 광학현미경을 이용하여 400배의 배율로 관찰한 결과, 대조군은 활액막세포의 증식과 만성염증세포의 침윤이 관찰되었으나 봉독약침군에서는 만성염증세포의 감소와 활액막이 정상에 가까운 정도로 개선됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

Table 5. The production of Pro-inflammatory Cytokine (IL-1β) from serum of CIA mice

Group	Pro-inflammatory Cytokine (pg/ml)
	IL-1β
AC	26.38±5.41
BV	32.27±4.49

Data are mean ± standard deviation of average.

AC : group of normal saline aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

BV : group of bee venom aqua acupuncture on Zusanli(ST36)

Arthritis Control(HEstain ×400)

Bee venom treatment (HE stain ×400)

Figure 7. Effect of Bee Venom Herbal Acupuncture on the histopathology of joints of CIA mice

IV. 고찰

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis; RA)은 만성관절염 중 퇴행성 관절염 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환으로서, 대부분의 환자에게서 진행성의 관절 파괴와 관절 변형, 삼출과 부종을 특징으로 하는, 병인이 아직 확실치 않은 자가면역 질환이다¹⁶⁾. 인구의 약 1~2%에서 이환되며 주로 30~50대의 여성에서 호발하는 질환으로 여자에서 약 2~4배 많다¹⁾.

류마티스 관절염의 직접적인 원인은 아직 규명되어 있지 않으나 대부분의 학자들은 약 30~40%의 유전적인 소인과 60~70%의 환경적인 요인들이 복합적으로 작용하여 관절염이 발생될 것으로 추정하고 있다¹⁾.

류마티스 관절염 치료를 위해 전통적으로 많이 사용되어 온 방법은 소위 피라미드법인데 점차적으로 강한 약물을 단계적으로 추가해 가는 방식으로, 첫째, 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-

inflammatory drugs, NSAIDs), 둘째, 부신피질 호르몬 제제(corticosteroids), 셋째, 항류마티스제제(disease modifying antirheumatic drugs, DMARDs), 넷째, 세포독성제제, 생물학적 치료제, leflunomide 및 기타 실험적인 치료법을 들 수 있으나, 현재는 처음부터 항류마티스제제를 적극적으로 사용하는 강력한 조기 치료 및 다양한 복합화학요법이 추천되고 있다¹⁾. 스테로이드 호르몬으로 보충된 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)은 일시적으로 염증을 억제시키고 증상의 호전을 가져올 수는 있지만, 장기간 계속되는 질환의 산물들을 효과적으로 개선시키지는 않는다¹⁷⁾. 더구나 NSAIDs는 위장관의 궤양유발, 우울증, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 야기할 뿐만 아니라³⁾ 더욱 강력한 치료제의 사용은 그만큼 더 많은 부작용을 일으킬 수 있으므로 이러한 단점 때문에 더 안전하고 효과적인 치료방법이 필요할 것으로 사려되며, 현재 임상에서 관절염 치료에 활용되고 있는 봉독약침이 이에 해당될 수 있을 것으로 기대된다.

蜂毒藥鍼(Bee venom Herbal acupuncture)이란 꿀벌의 독낭에 들어있는 봉독을 추출, 가공하여 질병과 관련한 부위 및 穴位에 주입함으로써 刺鍼 효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리 작용을 동시에 이용한 新鍼療法の 일종¹¹⁾으로 기원전부터 민간요법의 하나로 각종 질환에 응용되어 왔다⁵⁾.

봉독의 性味는 苦, 辛, 有毒하며, 약 40여 가지의 유효성분으로 구성되어 있는데, 크게 peptide components, non peptide components, enzymes로 구성되어 있으며, peptide components가 약 50%를 차지하고 있다⁴⁾.

지금까지 외국에서 발표된 봉독에 대한 연구를 살펴보면, 미국, 중국, 러시아, 영국, 독일, 스페인, 그리스 등 여러 국가에서 봉독에 대한 연구가 활발

히 이루어지고 있으며^{18,19)}, 그 내용으로는 Saini SS²⁰⁾ 등의 봉독 주요성분인 melittin이 PLA2(phospholipase A2)와 결합하여 PLA2의 활성화를 막음으로서 염증 매개체의 전구물질인 arachidonic acid의 생성을 막는다는 연구, Shkenderov S²¹⁾ 등의 adolapin이 prostaglandin 합성 기전을 억제하여 항염증과 항동통의 효능이 있다는 연구 등 봉독 구성성분의 작용과 기전에 관한 것들이 많았고, Lui CL²²⁾ 등의 봉독 과민성 및 관리: 환자의 봉독 탈감작 인지, Okamoto T²³⁾ 등의 배양된 생쥐의 심근세포에서의 melittin 심장독성 및 부하 칼슘과의 상호관계 등 봉독의 과민성과 독성에 관한 연구가 있었으며, Schmacher MJ²⁴⁾ 등의 면역 혈청 항체에 의한 봉독 치명률의 중화 등 면역과 관련된 연구 외에 단순포진, 다발성 경화증, 종양 등에 관한 연구가 보고되었다⁴⁾.

국내에서도 이미 30여 편 이상의 봉독 관련 논문이 나와 있으며, 권¹¹⁾ 등의 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 권⁴⁾ 등의 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin의 항암작용, 이²⁵⁾ 등의 봉독약침자극이 Methotrexate로 유발된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향, 이²⁶⁾ 등의 약침용 봉독액의 국소독성시험에 관한 연구 등 진통, 소염,鎮座, 항암효과, 면역기능 증강작용, 독성 등이 보고되었다.

관절염에 대한 봉독약침의 연구로는 권⁷⁾ 등이 임상적으로 무릎관절의 퇴행성 관절염에 대한 진통효과가 있음을 보고했고, Eiseman JL²⁷⁾ 등은 쥐에서 인위적 유발의 관절염과 약물대사의 억제에 대한 꿀벌 독의 효과에 대해 보고했다. 또 황⁸⁾ 등은 봉약침을 이용한 류마티스 관절염의 임상적 연구를 보고하였고, 왕⁶⁾ 등은 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적 연구를 보고하는 등 관절염에 대한 봉독약침에 관한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다.

실험적으로는 권⁹⁾ 등이 Mycobacterium butyrificum을 유발원으로 이용한 관절염 모델에 봉독약침 처치를 하여 다양한 진통효과 및 내외부 자극시 통증관련 신경세포의 핵내에서 발현되는 c-fos의 발현정도를 단백질면역조직화학법을 통하여 봉독약침의 효과를 보고 하였고, 김¹⁰⁾, 권¹¹⁾ 등은 Carrageenin을 유발원으로 이용해서 봉독이 항염증과 진통에 효능이 있음을 보고한 내용 등이 있으나, 이는 급성 관절염 실험모델이고, 만성 관절염 실험모델에 대한 연구는 부족한 실정이다.

만성 관절염 실험모델로는 관절의 주요 구성성분인 제2형 콜라겐(type II collagen; CII)을 이용한 실험모델이 잘 알려져 있다¹²⁾. 흰 쥐에 human type, chicken type, rat type 제2형 콜라겐을 피내 주사하여 33%~50%의 관절염을 유발시킨다고 보고¹³⁾한 이래, CIA(Collagen induced arthritis) 모델이 만성 관절염인 류마티스 관절염의 중요한 실험모델로 받아들여지고 있다. 백서와 생쥐에서 CIA 발생 빈도가 다르게 보고되고 있는 것은 주조직적 합성 유전자(major histocompatibility complex class II : MHC II)와 연관이 있으며²⁸⁾, H-2q haplotype을 가진 DBA/1 mice에는 50%~75%의 발생률을 보이고 牛型, 酉型, 人型 2형 콜라겐에 감수성을 보인다²⁹⁾. 또한 CII에 대해 반응하는 T림프구 및 B림프구가 류마티스 관절염 환자의 말초 혈액과 활액에서 존재하며 CII에 대한 항체가 환자의 혈청, 활액, 연골 등에서 흔히 발견됨으로써^{30,31,32)} 제2형 콜라겐이 RA 발생의 병인에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다³³⁾.

본 실험에서 약침이 주입된 足三里(ST36)는 調和氣血, 通調經絡의 穴性을 가졌으며 膝關節痛, 膝無力, 下肢痛, 浮腫, 身重脚痛, 脚氣, 下肢麻痺 등에 사용되고 있는 슬관절염의 대표적 穴位이다¹⁵⁾.

이에 본 연구에서는 봉독약침의 류마티스 관절염에 대한 효과를 관찰하기 위하여 제2형 콜라겐 유

도 관절염 실험모델을 유발한 후 족삼리(ST36)¹⁵⁾에 봉독약침을 처치하여, 관절염의 임상적 변화(관절염 발생률, 평균 관절염 지수, 관절염이 생긴 평균 다리 수)와 면역관련인자(TNF- α 와 IL-1 β)의 측정 및 조직검사를 하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

관절염의 발생률(Arthritis incidence (%) = (number of mice with Gr II or more / total number of mice) \times 100)에 있어서, 1차 접종 후 5주째부터 봉독약침액 및 생리식염수를 5회에 걸쳐 피하 주사한 결과, 대조군에서는 발생률이 계속 증가하다가 7주째와 8주째 모두 100%를 나타내었으나, 봉독약침군에서는 발생률이 6주째까지는 같이 증가해 가다가 7주째부터는 감소 곡선을 그리기 시작하여 8주째 유의한 발생률의 감소를 보였다.

평균 관절염 지수(Mean arthritis index = sum of arthritic severity of each leg of total mice / total number of mice)에 있어서, 봉독약침군은 7주째까지는 대조군과 마찬가지로의 상승곡선을 그렸으나 8주째에는 유의한 감소를 나타내었다.

관절염이 생긴 평균 다리의 수(Number of arthritic limb (%) = (number of limbs with Gr II or more / total number of the limbs) \times 100)에 있어서는 봉독약침군에서 7주째부터 감소 곡선을 그리기 시작하였으며, 7주째와 8주째 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.

양³³⁾의 제2형 콜라겐에 의해 경구관용 유도된 DBA/1 mice에서의 세포면역 반응에서 도출된 관절염의 임상적 변화와 비교해 보면, 발생률에 있어서는 5주째 가장 높은 100%의 발생률을 보였고 이때 실험군(BnCII 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 4 μ g 경구투여)에서는 평균 51.4%(각각 50%, 50%, 50%, 55.5%)를 나타내었다. 본 실험에서는 5주째 36.84%의 발생률을 보였고 대조군의 발생률이 최

고를 보인 8주째 실험군에서 31.57%를 나타냈다. 평균 관절염 지수에 있어서는 5주째 5.13(대조군)과 2.94(4개 실험군의 평균, 각각은 3.50, 2.75, 2.87, 2.63)로 본 실험에서의 5주째 1.50보다는 높았고 8주째 3.39보다는 낮았다. 관절염이 생긴 평균 다리 수에 있어서는 5주째 58.3%(대조군)과 19.8%(4개 실험군의 평균, 각각은 20.8%, 16.7%, 20.8%, 20.8%)로 본 실험에서의 5주째 12.50%보다는 높았고 8주째 26.62%보다는 낮았다.

RA는 자가면역 질환으로, 다양한 cytokine이 RA의 진행과 활액의 염증에 관련이 되어있고, RA 조직 분석에서 IL-1과 TNF- α 같은 proinflammatory cytokines가 풍부하며 관절염의 악화는 IL-1, TNF- α 의 치료에 의해 영향 받는다³⁴⁾. CD4+ T세포는 관절로 이동하고, 항원에서 유래된 peptide를 인식하여 몇몇의 cytokine을 분비함으로써, RA의 유발인자로 작용한다는 것은 일반적으로 의견이 일치되고 있다. 그러한 cytokine은 다른 세포를 강화시키는데, 특히 대식세포가 IL-1 β 와 TNF- α 같은 염증의 전구물질의 생산을 촉진한다^{35,36,37)}. 그러므로 CII에 대한 세포성 면역 반응의 억제제가 관절염의 진행을 결과적으로 변환시킬 수 있을 것이다³⁴⁾.

TNF- α 는 자연 및 특이면역반응의 매개자로 LPS(liposaccharide)에 의해 활성화된 단핵식세포에서 분비된다. 이는 혈관내피세포와 모세혈관에 신호를 보내 세포표면에 RANKL(파골세포 활성화 신호) 분자를 표시하여 뼈와 연골의 파괴와 악화를 유발한다. 즉 TNF- α 는 대표적인 염증유발 cytokine으로 synovial 세포에서 과잉으로 생산되어 synovial 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 다른 proinflammatory cytokines는 TNF- α 가 무력해지면 억제되어진다는 것으로 proinflammatory cytokines의 network가 TNF- α 에 연결되어 있다는 새로운 가설이 정립되었으며 이러한

가설은 TNF- α 가 RA에 있어서 치료의 목표가 된다는 것을 알 수 있게 하였다³⁷⁾. 본 실험에서 나타난 TNF- α 의 결과는 대조군에서 99.52 ± 6.5 pg/ml였고 봉독약침군에서는 59.79 ± 4.49 pg/ml를 나타내어, 유의성($p < 0.05$) 있는 변화를 보였다.

IL-1 β 는 LPS(liposaccharide)에 의해 활성화된 단핵식균세포에서 분비되는 것으로 면역반응의 급성단계에서 방출되며 T세포의 활성화와 조혈유도 작용을 한다. 본 실험에서 나타난 IL-1 β 결과는 유의성을 나타내지 못했다. IL-1 β 가 TNF- α 와 다르게 결과가 나온 것에 관하여 살펴보면, ATP는 monocytes와 macrophages로부터 IL-1 β 의 유리를 촉진하는데, ATP로 처치된 혈액 sample에서 IL-1 β 는 증가되었으나 TNF- α 는 감소되었다는 보고가 있으며³⁸⁾, TNF- α 와 IL-1 β 는 인간의 RA의 진행에 있어 주요한 cytokines로 인식되지만, TNF- α 는 관절 부종의 주요한 cytokine이고 IL-1 β 는 연골파괴의 주요 cytokine으로 그 생산은 TNF- α 와 독립적이라는 보고^{39,40)}가 있다.

활액막의 변화를 관찰하기 위한 조직검사에서는 대조군은 활액막세포의 증식과 만성염증세포의 침윤이 관찰되었으나 봉독약침군에서는 만성염증세포의 감소와 활액막이 정상에 가까울 정도로 개선됨을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 만성 류마티스 관절염의 대표적인 실험모델인 제2형 콜라겐 유도 관절염(CIA) 실험 동물에 봉독약침을 처치한 후 관절염의 발생률, 평균 관절염 지수, 관절염이 생긴 평균 다리의 수를 측정한 결과 각각 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 또한 면역관련인자의 측정에서는 봉독약침을 처치한 쥐에서의 염증매개 cytokine인 TNF- α 는 대조군에 비해 유의하게 억제되었지만 IL-1 β 는 유의한 변화가 없었다. 조직검사 결과에서는 대조군이 활액막세포의 증식과 만성염증세포의 침윤이 관찰된 반면 봉독약침군에서는 만성염증세

포의 감소와 활액막이 정상에 가까울 정도로 개선됨을 관찰할 수 있었다.

따라서 봉독약침이 제2형 콜라겐 유도 관절염 실험 동물에서 유의한 관절염 억제 효과가 인정되므로 임상에서 RA의 치료에 유효하게 적용될 수 있을 것으로 기대되며, 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사려된다.

V. 결론

봉독 약침이 제2형 콜라겐 유도 관절염(Collagen induced arthritis ; CIA)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 제2형 콜라겐으로 관절염을 유발시킨 DBA/1 마우스 족삼리에 봉독약침을 자극한 후 관절의 임상적 변화(관절염의 발생률과 평균 관절염 지수, 관절염이 생긴 평균 다리 수)와 면역관련인자(TNF- α 와 IL-1 β) 측정 및 조직검사를 한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 관절염의 발생률은 봉독약침군이 대조군에 비해 8주째부터 유의성 있는 감소를 나타내었다.
2. 평균 관절염 지수는 봉독약침군이 대조군에 비해 8주째부터 유의성 있는 감소를 나타내었다.
3. 관절염이 생긴 평균 다리 수는 봉독약침군이 대조군에 비해 7주째부터 유의성 있는 감소를 나타내었다.
4. TNF- α 는 봉독약침군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.
5. IL-1 β 는 봉독약침군이 대조군에 비해 유의성이 없었다.

6. 조직검사 결과 대조군은 활액막세포의 증식과 만성염증세포의 침윤이 관찰되었으나 봉독약침군에서는 만성염증세포의 감소와 활액막이 정상에 가까운 정도로 개선되었다.

VI. 參考文獻

1. 배상철. 류마티스 관절염 치료의 최신지견. 가정의학회지. 2001 ; 22(1) : 21-26.
2. Pincus T. Rheumatoid arthritis : disappointing long-term outcomes despite successful short-term clinical trials. J Clin Epidemiol. 1988 ; 41 : 1037-1041.
3. Pincus T, Marcum SB, Collahan LF. Long-term drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practice. II. Second line drugs and prednisone. J Rheumatol. 1992 ; 19 : 1885-1894.
4. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독성분 중 Apamin, Mellitin의 항암작용. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 129-145.
5. 인창식, 고희균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록; 마황퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지. 1998 ; 15(1) : 143-147.
6. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적 관찰. 대한침구학회지. 2001 ; 18(3) : 35-47.
7. Kwon YB, Kim JH, Yoon JH, Lee JD, Han HJ, Mar WC, Beitz AJ, Lee JH. The analgesic efficacy of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis : A comparative study with needle acupuncture. American Journal of Chinese Medicine. 2001 ; 29(2) : 187-199.
8. 황유진, 이진목, 황우준, 서은미, 장종덕, 양귀비, 이승훈, 이병철. 봉독약침을 이용한 류마티드 관절염의 임상적 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18(5) : 33-42.
9. Kwon Y, Lee J, Lee H, Han H, Mar W, Kang S, Beitz AJ, Lee J. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain. 2001 Feb 15 ; 90(3) : 271-280.
10. 김지영, 고희균, 김창환, 강성길, 박영배, 김용석. 봉독약침요법의 항염증작용에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1998 ; 15(1) : 317-331.
11. 권기록, 고희균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 1998 ; 15(2) : 97-103.
12. Krco CJ, Pawelski J, Harders J, McCormick D, Griffiths M, Luthra HS, David CS. Characterization of the antigenic structure of human type II collagen. J Immunol. 1996 ; 156(8) : 2761-2768.
13. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. J Exp Med. 1977 ; 146 : 857-868.
14. Trentham DE, Townes AS, Kang AH, David JR. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. J Clin Invest. 1978 ; 61 : 89-96.
15. 전국한외과대학 침구 경혈학교실. 침구학. 서

- 울 : 집문당. 1988 : 382-384.
16. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1997 : 1166-1170.
 17. Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis : strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol.* 1998 ; 37 : 546-554.
 18. 윤형석, 이재동, 이윤호. 암 관련 봉독 연구에 대한 고찰. *대한침구학회지.* 2000 ; 17(4) : 69-78.
 19. 윤형석, 김용석, 이재동. 통증 관련 봉독 연구에 대한 고찰. *대한약침학회지.* 2000 ; 3(1) : 157-175.
 20. Saini SS, Peterson JW, Chopra AK. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 18 ; 238(2) : 436-442.
 21. Shkenderov S, Koburova K. Adolapin—a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon.* 1982 ; 20(1) : 317-321.
 22. Lui CL, et al. Bee venom hypersensitivity and its management : patients perception of venom desensitiation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1995 ; 19(2) : 95-100.
 23. Okamoto T, et al. Melittin cardiotoxicity in cultured mouse cardiac myocytes and its correlation with calcium overload. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995 ; 133(1) : 150-163.
 24. Schmacher MJ, et al. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 ; 55(2) : 197-201.
 25. 이홍석, 고흥균, 김창환, 강성길, 박영배, 김용석. 봉독약침자극이 Methotrexate로 유발된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향. *경희한의대 논문집.* 1998 ; 21(1) : 347-359.
 26. 이종석, 고흥균, 김창환. 약침용 봉독액의 국소독성시험에 관한 연구. *대한침구학회지.* 1994 ; 11(1) : 227-250.
 27. Eiseman JL, von Bredow J, Alvares AP. Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1982 Mar 15 ; 31(6) : 1139-1146.
 28. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex(I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med.* 1981 ; 154 : 688-700.
 29. Brand DD, Meyers LK, Whittington KB, Stuart JM, Kang AH, Rosloniec EF. Characterization of the T cell determinants in the induction of autoimmune arthritis by bivariate $\alpha 1(\text{II})$ -CB11 in H-2q mice. *J Immunol.* 1994 ; 152 : 3088-3097.
 30. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH. Incidence and specificity of antibodies to type I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and

- other rheumatic disease as measured by 125I-radioimmunoassay. *Arthritis Rheum.* 1983 ; 26 : 1157-1163.
31. Choi EK, Gatenby PA, McGill NW, Bateman JF, Cole WG, York JR. Autoantibodies to type II collagen : occurrence in rheumatoid arthritis, other arthritides, autoimmune connective tissue disease and chronic inflammatory syndromes. *Ann. Rheum. Dis.* 1988 ; 47 : 313-316.
 32. Ronnelid J, Lysholm Y, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 1994 ; 37 : 1023-1029.
 33. 양형인. 제2형 콜라겐에 의해 경구관용 유도된 DBA/1 mice에서의 세포면역 반응. 가톨릭대 의학과 박사학위 논문. 1999.
 34. 김성일. 녹용약침액이 생쥐의 Type II collagen 유발 관절염의 면역반응에 미치는 영향. 동국대 한의학과 박사학위 논문. 2000.
 35. Firestein GS and Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheumatol.* 1990 ; 33 : 768-773.
 36. Panayi GS, Lachburry JS, Kingsley JS. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 1992 ; 35 : 729-736.
 37. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 1996 ; 14 : 397-440.
 38. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol.* 2000 Oct 15 ; 165(8) : 4615-4623.
 39. van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1999 Nov-Dec ; 17(6 Suppl 18) : S105-114.
 40. van den Berg WB, Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol.* 1999 Dec ; 13(4) : 577-597.