

원저

전갈약침이 adjuvant 유발 흰쥐의 관절활액막내 cytokine과 prostaglandin E₂에 미치는 영향

송인광 · 최우식 · 박준성 · 이승덕 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture on Immune Responses to Adjuvant Induced Arthritis in Rats.

In-Kwang, Song · Woo-Shik, Choi · Joon-Sung, Park
Seung-Deok, Lee · Kap-Sung, Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion, college of Oriental Medicine
Dong-Guk University

Objective : The purpose of this study is to investigate the immunohistological effect of *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture in treating the arthritis, performed several experimental items : those are paw edema, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and PGE₂.

Methods : All the male Sprague Dawley rats used in this study were bred and maintained in our pathogen-free rat colony and were 8 weeks of age at the start of te experiment. The experimental model of arthritis was induced by injection of 50 μ g/ μ l adjuvant(mineral oil mixed Mycobacterium butyricum). *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture was injected into ST36(足三里) of rats daily for 21 days. Immunohistological analysis was carried out to assess paw edema, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and PGE₂ expression in synovial membrane and sera *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture injected.

Results : *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture group showed a decrease with statistical significance, in paw edema, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and PGE₂ in synovial membrane and sera compared with control group.

- 접수 : 2002년 3월 1일 · 수정 : 3월 8일 · 채택 : 2002년 3월 16일
· 교신저자 : 김갑성, 경북 경주시 용강동 357, 동국대 경주한방병원 침구과(Tel. 054-770-1558)
E-mail : kapsung@unitel.co.kr

Conclusion : *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture stimulation inhibited the development of immunity to adjuvant induced arthritis in rats. Thus, *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture may have preventive effects on autoimmune inflammatory joint diseases as arthritis. The effect of *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture on the immune function and the disease activity in patients with arthritis warrants further investigation.

Key words : Arthritis, *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture, cellular immunity, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and PGE₂.

I. 서론

한의학에서痺證¹⁾, 歷節²⁾, 歷節風^{3,4)} 및 白虎歷節風⁵⁾ 등은 관절의 부종과 통증, 관절의 변형, 피부상 결절 및 운동의 제한 등을 특징으로 하는 질환으로 임상증상에서 현대의학의 각종 염증성 관절염과 유사하다.

염증성 관절염은 관절을 침범하는 모든 염증을 일컫는 일반적인 용어로 그 원인은 다양하고, 병발의 급성도 또는 만성도, 염증의 원인 등을 근거로 퇴행성 관절염, 류마티드 관절염, 화농성 관절염, 결핵성 관절염, 통풍성 관절염 및 외상성 관절염 등으로 구분할 수 있다⁶⁾.

최근의 각종 염증성 관절염에 대한 연구를 살펴보면 각종 관절염에서 염증부위의 활막세포에서는 cytokine의 상승 및 prostaglandin의 생성 증가 등이 나타난다고 알려져 있다⁷⁻⁹⁾.

따라서 최근의 염증성 관절염에 대한 침구학적 연구들은 주로 이와 같은 활막세포에서의 염증 유발인자들에 대해 초점을 맞추고 있는데 黃柏藥鍼¹⁰⁾, 牛膝藥鍼과 蜂毒藥鍼¹¹⁾, 黃柏藥鍼과 威靈仙藥鍼¹²⁾, 澤蘭藥鍼¹³⁾, 赤芍藥鍼¹⁴⁾, 桂枝藥鍼¹⁵⁾ 및 牛黃·熊膽·麝香 複合藥劑藥鍼¹⁶⁾ 등이 관절염에서 cyto-

kine을 억제한다는 보고가 있고, 熊膽·牛黃藥鍼과 猪膽·牛黃藥鍼¹⁷⁾이 관절염에서 prostaglandin E₂를 억제한다는 보고가 있었으나, 通絡止痛, 息風止痺, 解毒散結의 효능이 있는 전갈 약침에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 전갈약침(*Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture)¹⁸⁾을 사용하여 adjuvant로 유발된 관절염의 부종과 염증성 cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), interleukin-8(IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 변화 및 통증유발과 관련된 prostaglandin E₂(PGE₂)의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 전갈(全蝎, *Buthus martensi* Karsch, 이하 BMK로 약칭함)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 동물

흰쥐는 효창 사이언스사(Daegu, Korea)로부터 구

입하여 본 대학 동물사육실에서 일정한 조건(온도 22±2℃, 습도 40~60%)하에 일주일 이상 적응시킨 8주령(체중 130g 내외)의 Sprague Dawley계의 수컷 흰쥐를 사용하였다. 물 및 사료는 자유로이 먹도록 하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 중 adjuvant의 주성분인 열-약화시킨 Mycobacterium butyricum은 Difco Laboratory사(Detroit, MI, U.S.A.)로부터, TNF-α 및 IL-8의 정량에 사용된 Enzyme immunoassay kit는 R&D systems사(Minneapolis, MN, U.S.A.)로부터, prostaglandin E₂(PGE₂) 측정에 사용한 anti-PGE₂ monoclonal antibody 시약은 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI, U.S.A.)로부터 구입하여 측정하였다. 그리고, IL-1β 및 IL-6의 정량에 사용한 3 종류의 항체(ON-1, NY-2, YB-3) 및 polyclonal antibody들은 동국대학교 의과대학 약리학교실에서 제공받아 사용하였다.

한편 사용기기로서 rotary evaporator는 BUCHI사(BUCHI RE121, Switzerland)로부터, CO₂ 배양기는 Vison사(Vision Biotec, VS-9180, Korea)로부터, UV spectrophotometer는 Gilford사(Gilford, Response™, U.S.A.)로부터, ELISA reader는 Molecular Devices사(VERSA max, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 전갈약침액의 조제

본 실험에서는 水製-alcohol침법¹⁹⁾에 의해 다음과 같이 전갈약침액을 제조하였다. 먼저 전갈 60g을 수직으로 환류냉각관이 부착된 원저 flask에 넣고, 증류수 400ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 그 후 여과액 중에 남아 있는 미량의 침전물을 제거하기 위해 4℃에서 2,500 rpm으로 10분간 원심 분리

하여 그 상층액을 취하였다. 상층액을 다시 rotary evaporator로 감압농축하고, 농축액에 증류수를 가하여 전량을 50ml가 되도록 한 다음, membrane filter (0.22μm, Whatman®, Germany)로 여과하였다. 위의 방법으로 제조한 전갈 추출액 50ml에 ethanol을 가하여 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 이 때 ethanol은 99.9% ethanol을 사용하였으며, 첨가량은 전갈추출액이 단계별로 75%, 85% 및 95% ethanol 용액이 되게하면서 침전물을 제거한 다음 감압농축하였다. 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절하여 전량이 200ml가 되게 한 다음 저온에서 24시간 방치한 후, membrane filter로 여과하여 전갈약침액의 원액(×1)으로 사용하였으며 필요에 따라 3배 농축(×3) 및 2배 희석(×0.5)하여 사용하였다(Scheme 1).

2) 관절염의 유발²⁰⁾

흰쥐에 류마티드 관절염과 유사한 조건을 유발시키기 위해 열-약화시켜 건조한 Mycobacterium butyricum를 mineral oil에 현탁시킨 액(adjuvant)을 흰쥐의 오른쪽 발에 1회 피하주사(50μg/50μl/rat)하였다.

Table 1. Classification of Experimental Groups

Group	Treatment	Rats	Locus	Volume/rat	Duration
Normal	None	5	None	None	21
Control	Normal saline	5	ST36	0.4ml	21
Blank locus	×1 BMK	5	BL	0.4ml	21
	×1 BMK	5	ST36	0.4ml	21
Sample	×3 BMK	5	ST36	0.4ml	21
	×0.5 BMK	5	ST36	0.4ml	21

Normal : Non-treated group

Control : Group of normal saline to ST36 in rats with adjuvant induced arthritis

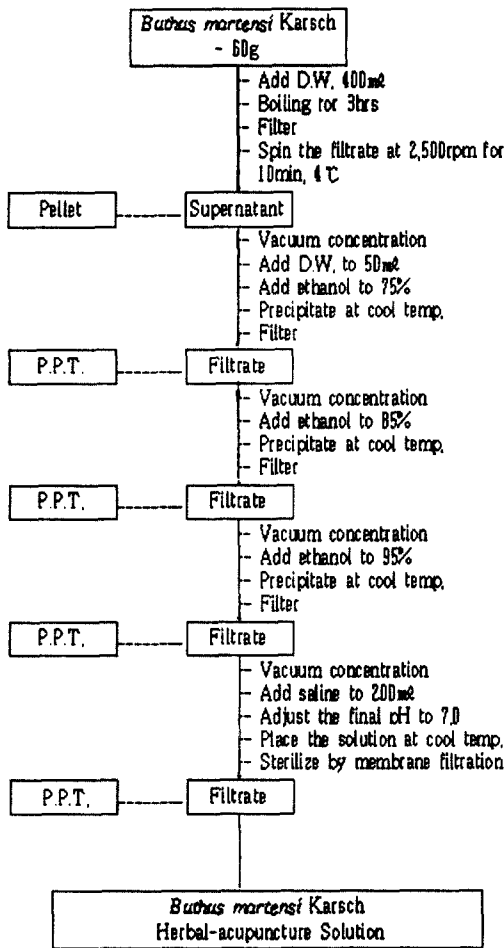
Blank locus(BL) : Group of BMK Herbal-acupuncture to

coccyx locus in rats with adjuvant induced arthritis

Sample : Group of BMK Herbal-acupuncture to ST36 in rats with adjuvant induced arthritis

BMK : *Buthus martensi* Karsch Herbal-acupuncture solution

Scheme 1. Preparation of *Buthus martensi* Karsch Herbal-Acupuncture Solution



3) 실험군의 분류 및 처치

실험은 흰쥐 5마리를 각각 1군으로 하여 처치하지 않은 정상군과 adjuvant로 관절염을 유발시킨 대조군 (Control), adjuvant 관절염 유발 후 매일 전갈약침 각

각 원액(×1), 3배 농축액(×3) 및 2배 희석액(×0.5)을 족삼리(足三里, zú sān lǐ ST₃₆)에 자극한 실험군 (Sample) 및 미추부 임의혈에 전갈약침 원액을 자극한 임의혈 자극군 (Blank locus, BL)으로 분류하였다.

한편, 대조군은 전갈약침 대신 생리식염수(0.9% NaCl 용액)를 투여하였다.

4) Synovial fluid의 채취

흰쥐의 부어오른 관절로부터 synovial fluid의 채취는 멸균된 insulin syringe(SHINA Co., Seoul, Korea)를 사용하여 eppendorf tube에 모아 6,000 rpm에서 30분간 원심분리한 뒤 상층액을 희석하여 prostaglandin E₂의 측정에 사용하였다.

5) Paw volume의 측정²¹⁾

생성된 부종의 용적은 adjuvant를 투여하기 직전에 측정된 volume을 control volume(day 0)으로 하였으며 data는 매일 같은 시각에 측정된 volume을 control volume과 비교하여 percentage로 나타내었다. 측정에는 plethysmometer(UGO, Basil, Italy)를 사용하였다.

6) Interleukin-1β의 농도 측정

흰쥐의 혈청속의 IL-1β의 농도는 sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법을 이용하여 측정하였다²²⁾. 즉 anti-IL-1β polyclonal antibody(5μg/ml)를 96 well plate에 PBS buffer를 이용하여 미리 over night로 흡착시켜 놓는다. 흰쥐 혈청을 PBS buffer로 희석한 다음 50μl씩 plate에 가한 다음 실온에서 1시간 배양시킨다. 그 후 96 well plate를 0.05% Tween-PBS로 3회 세척하고 그 위에 biotin화시킨 anti-IL-1β monoclonal antibody(ON-1, IgG_{2b}, 5μg/ml)를 다시 가하여 1시간 배양한다. 3회 세척한 후 horse radish peroxidase(HRP) conjugated streptavidin을 가하여 1시간 반응 시킨

후, o-phenylenediamine을 기질로 하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Interleukin-6의 농도 측정

흰쥐의 혈청속의 IL-6의 농도는 Nam 등²³⁾의 sandwich ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 즉 anti-IL-6 monoclonal antibody (NY-2, IgM, 5 μ g/ml)를 96 plate well에 PBS buffer를 이용하여 미리 over night로 흡착시켜 놓는다. 그리고 희석한 혈청을 50 μ l씩 plate에 가한 다음 실온에서 1시간 배양시킨다. 그 후 well plate를 0.05% Tween-PBS로 3회 세척하고 그 위에 biotin화시킨 anti-IL-6 monoclonal antibody (YB-3, IgG₁, 5 μ g/ml)를 다시 가하여 1시간 배양한다. 3회 세척한 후 horse radish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin을 가하여 1시간 반응시킨 후, o-phenylenediamine을 기질로 하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Interleukin-8의 농도 측정²⁴⁾

IL-8의 농도측정에 사용한 enzyme immunoassay kit는 R&D systems사의 제품을 사용하였다. 먼저 각각의 군으로부터 희석한 혈청 50 μ l를 anti-IL-8 polyclonal antibody가 coat되어 있는 well에 넣은 다음 실온에서 2시간 배양한다. 그 후 well plate를 세척하고 peroxidase conjugated secondary antibody를 100 μ l 가한다. 다시 실온에서 2시간 배양 후 세척한 다음 peroxidase의 기질시약을 100 μ l 가한 다음 450nm에서 흡광도를 측정한 뒤 검량곡선과 비교하여 정량하였다.

9) Tumor necrosis factor- α 의 농도 측정²⁵⁾

TNF- α 의 농도측정에 사용한 enzyme immunoassay kit는 R&D system(R&D System, Minneapolis, Minn)사의 제품을 사용하였다. 희석혈청 50 μ l를 anti-TNF- α monoclonal antibody가 coat되어 있는 well에 넣은 다음 실온에서 2시간 배양한다. 그 후

well plate를 10mM phosphate buffered saline(pH 7.4)-0.05% Tween 20으로 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated secondary antibody를 100 μ l 가한다. 다시 실온에서 2시간 배양 후 세척한 다음 phosphatase의 기질시약 {1 mg of disodium p-nitrophenyl phosphate, 1ml of 1M diet-hanolamine buffer(pH 9.5) containing 0.5mM MgCl₂}을 100 μ l 가한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정 후 검량곡선과 비교하여 정량하였다.

10) Prostaglandin E₂의 농도 측정

PGE₂의 농도 측정은 Enzyme immunoassay kit를 사용하였으며 synovial fluid으로부터 PGE₂의 양을 측정하였다²⁶⁾. 즉, synovial fluid를 3,000 rpm에서 원심 분리하고 상층액을 이용하여 PGE₂의 함량을 측정하였다. 그 방법은 먼저 EIA buffer를 비특이적 결합(NBS)을 한 well에 첨가하고, 50 μ l의 buffer를 최대결합(B₀)을 한 well에 첨가하였다. 50 μ l의 PGE₂ standard (7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml)나 EIA buffer로 희석한 상층액 sample을 각 well에 첨가하였다. 50 μ l의 PGE₂ acetylcholinesterase tracer를 total activity와 blank well을 제외한 각각의 well에 넣고, 50 μ l의 anti-PGE₂ monoclonal antibody를 total activity(TA)와 비특이적 결합(NSB)그리고 blank(B) well을 제외한 각각의 well에 넣었다. 플라스틱 필름으로 plate를 덮고 4°C에서 18시간 반응시켰다. 그리고 wash buffer로 5 μ l 세척한 후, 200 μ l의 Ellman's 시약을 각각의 well에 첨가하고 5 μ l의 tracer를 total activity well에 넣었다. Plate를 plastic film으로 덮고 60~90분 동안 develop시킨 후 405nm에서 흡광도를 읽었다.

11) 통계처리

본 실험에서 얻은 실험군의 결과에 대하여 student's t-test를 실시하여 유의성을 검정하였으며, p값이

0.05이하인 경우($p < 0.05$)에 유의성을 인정하였다.

III. 결과

1. Paw volume에 미치는 효과

전갈약침을 투여한 실험군에서 adjuvant 투여 후 9일까지는 관절염을 억제하지 못했으나, 11일~21일 사이에서 부종의 억제가 명확히 나타났으며, 각 날짜별로 점차적으로 억제되는 것이 나타났다. 즉, 21일째에는 대조군(Control)에 비해 3배 전갈약침 자극군(x3)에서는 53.1%, 1배 전갈약침 자극군(x1)에서는 47.9%, 그리고 0.5배 전갈약침 자극군(x0.5)에서는 35.4%의 억제효과를 보였다. 한편, 전갈약침(x1)을 투여한 임의혈 자극군(BL)에서도 21일째에 31.3%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

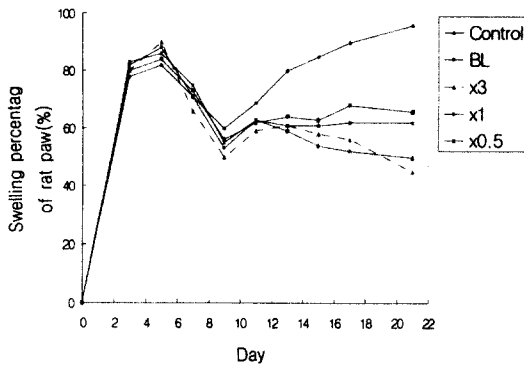


Fig. 1. Effect of BMK on Adjuvant Induced Arthritis in Rat

2. Interleukin-1 β 의 생성에 미치는 효과

대조군이 정상군(Normal)에 비하여 3.3배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.005$, $p < 0.01$)에서 억제되었으나, 0.5배 전갈약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 12.2% 및 10.2%의 억제효과가 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 그리고, IL-1 β 의 생성이 전갈약침액의 농도에 비례하여 억제되는 경향성을 나타내었다(Fig. 2).

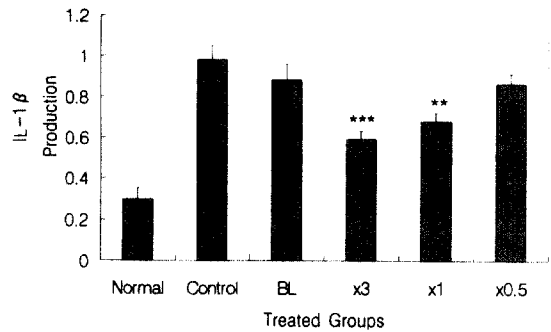


Fig. 2. Effect of BMK on IL-1 β Production in Rat Sera of Adjuvant Induced Arthritis

The values are expressed as the mean \pm SD of five experiments.

** $p < 0.01$,

*** $p < 0.005$ as compared to control.

3. Interleukin-6의 생성에 미치는 효과

대조군이 정상군에 비하여 2.9배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.01$, $p < 0.05$) 억제되었으나, 0.5배 전갈약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다(Fig. 3).

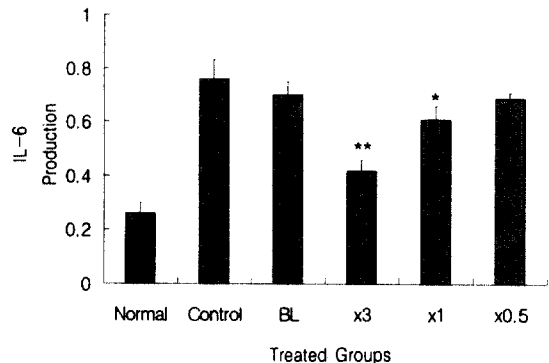


Fig. 3. Effect of BMK on IL-6 Production in Rat Sera of Adjuvant Induced Arthritis

The values are expressed as the mean \pm SD of five experiments.

* $p < 0.05$,

** $p < 0.01$ as compared to control.

4. Interleukin-8의 생성에 미치는 효과

대조군이 정상군에 비하여 11.2배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게 ($p<0.05$, $p<0.01$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다(Fig. 4).

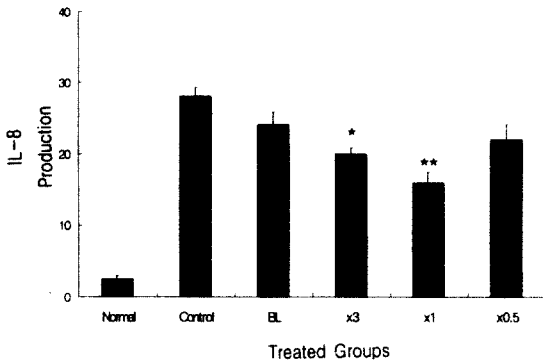


Fig. 4. Effect of BMK on IL-8 Production in Rat Sera of Adjuvant Induced Arthritis

The values are expressed as the mean±SD of five experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ as compared to control.

5. Tumor necrosis factor- α 의 생성에 미치는 효과

대조군이 정상군에 비하여 4.5배 증가하였고, 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게 ($p<0.05$, $p<0.05$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다(Fig. 5).

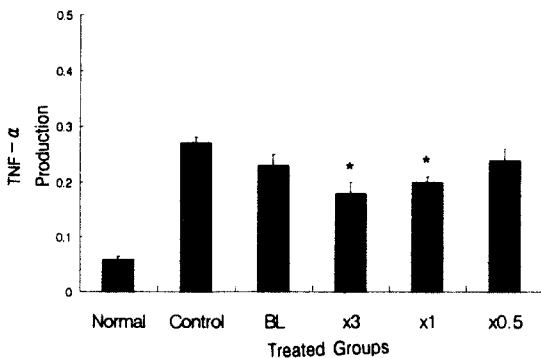


Fig. 5. Effect of BMK on TNF- α Production in Rat Sera of Adjuvant Induced Arthritis.

The values are expressed as the mean±SD of five experiments.

* $p<0.05$ as compared to control.

6. Prostaglandin E2생성에 미치는 효과

대조군이 정상군에 비하여 4.4배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게 ($p<0.01$, $p<0.01$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다(Fig. 6).

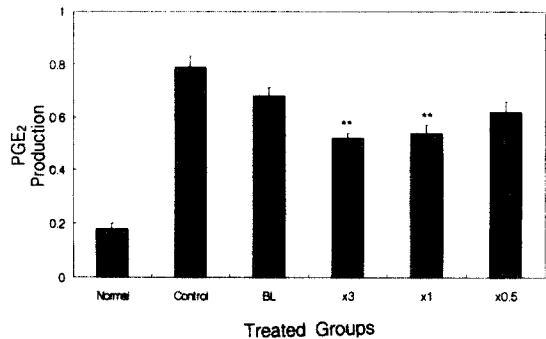


Fig. 6. Effect of BMK on PGE₂ Production in Rat Synovial Fluid of Adjuvant Induced Arthritis

The values are expressed as the mean±SD(standard deviation) of five experiments. ** $p<0.01$ as compared to control.

IV. 고찰

류마토이드 관절염(Rheumatoid Arthritis)은 활액막에 만성적 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위 조직을 파괴하고, 진행됨에 따라 특징적인 관절 변형 및 강직이 유발되는 질환이다⁶⁾.

류마토이드 관절염의 원인이나 발생기전은 많은 연구에도 불구하고 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 일반적으로 일차적 면역계의 이상에 의한 자가면역

질환으로 생각되고 있으나, HTLV-1, cytomegalovirus(CMV), Epstein-Barr virus 등의 virus에 의한 감염이나, borrelia, mycobacterium 등의 bacteria에 의한 감염, 섭취하는 음식 등의 외적 요인과, hormone의 불균형 그리고 유전적 요인 등의 내적 요인이 모두 발병 기전에 관여하는 것으로 의심되고 있다²⁷⁾.

지금까지 밝혀진 류마토이드 관절염의 병태생리 기전을 살펴보면, 류마토이드 활액막의 monocyte나 macrophage 또는 lymphocyte 등 활성화된 염증 세포에서 생성된 cytokine들과 lysosomal hydrase 등의 작용으로 염증이 유발된다. 그리고, 관절강 내 구성 성분의 변화는 활액 내의 type II collagen의 증가, proteoglycan의 감소, heat shock protein의 증가 및 IL-1, IL-6, IL-8과 TNF- α 등의 proinflammatory cytokine의 증가 등을 들 수 있으며, 이러한 구성 성분의 변화는 심각한 자가면역반응을 초래하여 관절 손상을 유도하게 된다. 그외 type II collagen, collagenase, prostaglandins E₂(PGE₂), stromelysin, plasminogen activator 등의 관절강내 구성 물질의 변화를 들 수 있다⁷⁾.

퇴행성 관절염은 관절연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환이다. 그 원인은 불확실하나, 퇴행성 관절염과 관련하여 연골의 동화 작용과 이화 작용 사이에 평형을 방해한다고 생각되는 인자들은 류마토이드 관절염의 관절활액막내 증가된 cytokine과 유사하다고 알려져 있다. 이 중 IL-1과 TNF가 중요하다고 알려져 있으며, IL-1에 의해 생성이 촉진되는 PGE₂ 또한 관절염의 증상과 많은 관련이 있다^{8,9)}.

歷節風에 대한 최초의 기재는 《金匱要略》에서의 ‘歷節’이다²⁾. 이후 巢³⁾와 王⁴⁾은 이를 ‘歷節風’으로, 朱⁵⁾는 ‘白虎歷節風’으로 칭하였으며, 이는 모두 痺證의 범주에 속하고²⁸⁾, 樓²⁹⁾의 《醫學綱目》에서

“四肢疼痛如鎚鍛，不可忍”이라 하였듯이 歷節風은 痺證 중에서 그 양태가 극심하다는 특징을 갖는다. 歷節風의 증상에 대해서 張²⁾은 “歷節風，不可屈伸”，“諸肢節疼痛，身體魁羸，脚腫如脫”로, 孫³⁰⁾은 “夫歷節風者，人久不治者，令人骨節蹉跌，變形癩病”으로 본병의 임상 증상을 심한 관절통, 관절의 변형, 피부상 결절 및 운동의 제한 등의 특징으로 설명하고 있다. 이는 현재에 이르러 류마토이드 관절염 및 퇴행성 관절염을 歷節風의 범주로 보는 근거가 되고 있다³¹⁾.

한의학에서는 歷節風의 치료에 특히 蜈蚣, 全蝎, 水蛭 등 독성이 있는 충류 약물을 사용하는데, 충류 약물들은 항원을 제거하거나 활성화면역세포의 생산을 억제하여 면역반응을 억제하는 것으로 알려져 있다³²⁾.

관절염을 포함한 모든 염증은 미소혈관의 확장, 혈액성분의 조직간극으로의 유출, 백혈구의 염증반응으로의 유주 및 조직의 변성과 섬유화 등을 포함한 연쇄적 생체반응이다. 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 통각과민 및 기능장애의 5가지 증상을 나타낸다. 각 단계의 발현기전은 서로 다르며 다양한 약리학적 활성물질이 국소적으로 생성 유도되어 반응을 매개한다. 이와같은 물질을 chemical mediators라 하며 PGs, histamine, serotonin, leukotriene 등이 여기에 속한다. 또한 염증영역으로 유주한 다핵백혈구, 단핵식세포(macrophage), 림프구에서 방출하는 다양한 cytokine, 활성산소(superoxide anion radicals), 가수분해 효소 및 염기성 단백질 등이 염증반응에 직접적으로 관여하게 된다³³⁾.

염증의 chemical mediators 중 약리 및 생리학적으로 중요한 PG은 세포막에 존재하는 인지질에서 유래된 불포화지방산의 대사산물이며, PG의 생성에는 phospholipase A₂, cyclooxygenase 및 hydroperoxidase가 관여하는 일련의 산화반응이다. 이들 중 특히 PGE₂는 내인성 발열물질이라고 알려진 IL-1 β , IL-8 및 TNF- α 에 의해 생성이 유도되어 bradykinin

과 같은 강력한 발염물질의 작용을 증강시킬 뿐만 아니라 시상하부의 체온조절중추에 작용하여 체온상승을 유발한다. 또한 PGE₂는 골수세포에 작용하여 파골세포(osteoclast)의 전구세포(preosteoclast)를 유도하는 작용이 있다고 알려져 있다³⁴⁾.

따라서 저자는 通絡止痛, 息風止癢 및 解毒散結의 효능이 있어 歷節風에 다용되는 全蝎¹⁷⁾을 약침 제제로 사용하고, 足陽明胃經의 合穴로서 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元 및 祛邪防病的 효능으로 膝關節痛 치료에 사용되는 足三里³⁵⁾를 취혈하여, 관절 부종의 변화, 혈액 내 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 TNF- α 와 synovial fluid에서 PGE₂의 변화를 관찰하였다.

실험에 사용된 全蝎은 극각동갈과(Buthidae)에 속한 Buthus martensi Karsch를 乾燥하거나 鹽漬하여 乾燥한 全蟲體로 性味는 溫鹹辛이며, 效能은 息風止癢, 通絡止痛, 解毒散結으로 膝關節痛, 風濕頑痺, 破傷風, 小兒驚風, 中風, 口眼窩斜, 半身不遂, 偏正頭痛, 瘡瘍 및 癩癧 등을 치료한다¹⁷⁾.

한편 실험에 사용된 穴位인 足三里는 足陽明胃經의 合穴로 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病的 효능으로 膝關節痛, 四肢의 浮腫, 脚氣, 腹痛, 卒心痛, 腰痛, 半身不遂 및 下肢麻痺 등을 치료한다³⁵⁾.

본 실험에서 부종억제에 관한 결과를 보면, 전갈약침을 투여한 실험군에서 adjuvant 투여 후 9일까지는 관절염을 억제하지 못했으나, 11일~21일 사이에서 부종의 억제가 명확히 나타났으며, 각 날짜별로 점차적으로 억제되는 것이 나타났다. 즉, 21일째에는 대조군에 비해 3배 전갈약침 자극군에서는 53.1%, 1배 전갈약침 자극군에서는 47.9%, 그리고 0.5배 전갈약침 자극군에서는 35.4%의 억제효과를 보였다. 한편 전갈약침($\times 1$)을 투여한 임의혈 자극군에서도 31.3%의 억제효과를 나타내었다.

류마티오이드 관절염에서 IL-1 β 는 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, neutrophil, lymphocyte 및 monocyte의 화학유주 및 섬유모세포 증식하며, 활막

섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE₂와 collagenase 생산을 증가시킨다³⁶⁾. 또한 류마티오이드 관절염의 초기에 내피 세포의 다양한 반응을 자극하고 다른 세포의 이주를 도와주며 후기에는 PGE₂와 collagenase를 생산하여 골 흡수 및 연골 파괴에 관여한다. 또한 preosteoclast를 유도하여 osteoclast의 생성을 촉진시킨다³³⁾.

본 실험에서 관절염 발생에 중요한 요소인 IL-1 β 의 생성은 대조군이 정상군에 비하여 3.3배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.005$, $p < 0.01$)에서 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 12.2% 및 10.2%의 억제효과가 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 그리고, IL-1 β 의 생성이 전갈약침액의 농도에 비례하여 억제되는 경향성을 나타내었다.

이와 같은 결과는 黃柏藥鍼¹⁰⁾, 牛膝藥鍼과 蜂毒藥鍼¹¹⁾, 黃柏藥鍼과 威靈仙藥鍼¹²⁾, 澤蘭藥鍼¹³⁾, 赤芍藥鍼¹⁴⁾, 桂枝藥鍼¹⁵⁾ 및 牛黃·熊膽·麝香 複合藥劑藥鍼¹⁶⁾ 등이 유발된 관절염에서 과잉생산된 IL-1 β 를 감소시켰다는 보고와 유사한 것으로 사료된다.

Okumoto 등³⁷⁾은 IL-6이 급성 조절단백으로 류마티오이드 관절염에서 염증 반응의 주요매개체로 작용하고, 혈청 및 관절염에 손상된 관절의 관절액에서 IL-6의 활성도가 증가하며, 특히 외상성 관절염 및 퇴행성 관절염보다 높은 활성도를 보여 질환의 활성도와 연관성이 있다고 보고하고 있다. 따라서 류마티오이드 관절염에서 IL-6이 면역반응의 매개체로서 병태 생리에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되고, 그 역할은 특정 IL-1이나 TNF- α 의 효과를 증폭시키는 것으로 추정된다.

본 실험에서 IL-6의 생성은 대조군이 정상군에 비하여 11.2배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.01$, $p < 0.05$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다.

이와 같은 결과는 澤蘭藥鍼¹³⁾, 赤芍藥鍼¹⁴⁾ 등이 유발된 관절염에서 과잉생산된 IL-6을 감소시켰다는 보고와 유사한 것으로 사료된다.

한편 IL-8의 생성은 대조군이 정상군에 비하여 2.9배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.05$, $p < 0.01$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다.

TNF- α 는 IL-1 β 와 마찬가지로 대식세포에서 분비되며, 류마티드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, neutrophil, lymphocyte 및 monocyte의 화학유주 및 섬유모세포 증식, 활막섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE₂와 collagenase 생산을 증가시킨다³⁶⁾.

본 실험에서 TNF- α 의 생성은 대조군이 정상군에 비하여 4.5배 증가하였고, 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.05$, $p < 0.05$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다.

이와 같은 결과는 澤蘭藥鍼¹³⁾, 赤芍藥鍼¹⁴⁾ 등이 유발된 관절염에서 과잉생산된 TNF- α 을 감소시켰다는 보고와 유사한 것으로 사료된다.

본 실험에서 PGE₂의 생성은 대조군이 정상군에 비하여 4.4배 증가하였고, 실험군에서는 3배 및 1배 전갈약침 자극군에서 각각 유의성있게($p < 0.01$, $p < 0.01$) 억제되었으나, 0.5배 전갈 약침 자극군과 임의혈 자극군에서는 유의성이 없었다.

이와 같은 결과는 熊膽·牛黃藥鍼과 豬膽·牛黃藥鍼¹⁷⁾이 유발된 관절염에서 과잉생산된 PGE₂을 감소시켰다는 보고와 유사한 것으로 사료된다.

따라서 adjuvant에 의해 유도되어지는 PGE₂의 생성증가가 전갈약침의 전처치에 의해 감소한다는 사실과 전갈약침이 항염증작용을 가진다는 사실은 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 생성저해작용으로 더욱 뒷받침되어진다.

본 실험에서는 흰쥐에 adjuvant로 류마티드 관절염과 유사한 환경을 유발시키고 synovial fluid에서 PGE₂의 양이 전갈약침의 투여로 유의성있게 감소하였다. 이것은 전갈약침이 관절의 활막세포에서 인지질 대사와 관련된 효소들(phospholipase A₂, cyclooxygenase)의 활성을 억제시킨다고 여겨진다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 전갈약침은 흰쥐에서 adjuvant에 유발되는 관절염과 관련하여 염증유발 중간매개체인 cytokine의 생성을 억제시키고 통증전달물질인 PGE₂의 생성을 억제시키는 것으로 보아서 염증화 과정의 억제 및 염증전달물질의 생성을 저해시키는 작용이 있는 것으로 사료된다. 그리고, 전갈약침의 足三里穴 투여가 관절염 동물 모델의 염증화 과정을 억제하는 것이 관찰되어, 초기의 염증성 관절염의 침구치료에 응용이 가능하리라고 생각되며, 앞으로 蜈蚣, 水蛭 등과 같은 여타의 충류 약물의 관절염에 대한 면역학적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

전갈약침이 adjuvant 유발 관절염에서 염증화 과정에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 흰쥐에 adjuvant 투여로 관절염을 유발한 후 전갈약침을 매회 400 μ l씩 21회 자극한 후 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 및 PGE₂의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 전갈약침이 adjuvant에 의해 유도된 부종을 최종적으로 $\times 3$ 의 농도에서는 53.1%, $\times 1$ 의 농도에서는 47.9% 그리고 $\times 0.5$ 의 농도에서는 35.4%의 억제효과를 나타내었다.
2. 관절활액막내 IL-1 β 는 3배 전갈약침 자극군에서 매우 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었고, 1배 전갈약침 자극군에서도 현저하게 유의성 있는 감소를 나

타내었다.

3. 관절활액막내 IL-6는 3배 전갈약침 자극군에서 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었고, 1배 전갈약침 자극군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

4. 관절활액막내 IL-8은 3배 전갈약침 자극군에서 유의성 있는 감소를 나타내었고, 1배 전갈약침 자극군에서 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었다.

5. 관절활액막내 TNF- α 는 3배 전갈약침 자극군과 1배 전갈약침 자극군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

6. 관절활액막내 PGE₂는 3배 전갈약침 자극군과 1배 전갈약침 자극군에서 현저하게 유의성 있는 감소를 나타내었다.

VI. 참고문헌

1. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:20,54,92,162.
2. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北:大聯國風出版社. 1973:32-33.
3. 巢元方. 諸病源候論. 北京:人民衛生出版社. 1983:51.
4. 王燾. 外臺秘要(中國醫學大系 4). 서울:여강출판사. 1987:442-736.
5. 朱丹溪. 丹溪心法. 서울:五洲出版社. 1978:206-212.
6. 대한정형외과학회. 정형외과학. 제5판. 서울:최신의학사. 2000:157-174.
7. 菊地浩吉 外. 最新免疫學. 서울:집문당. 1985:33-35,100.
8. Chambers M, Bayliss M, Mason. R. Chondrocyte Expression of IL-1, IL-6, IGF-1 and TGF- α in Murine Osteoarthritis. Transactoins of The Annual Meeting- Orthopaedic Research. 1996;42(2):756.
9. Pulsatelli L, Melchiorri C, Silvestri T, Frizziero L, Meliconi R, Facchini A. IL-1, TNF and Nitric Oxide Synthase Expression in Synovial Membrane and Cartilage from Patients with Osteoarthritis and Inflammatory Arthritis. Transactoins of The Annual Meeting-Orthopaedic Research. 1998;44(2):882.
10. 박철원, 김갑성. Lipopoly saccharide 유발 토끼關節炎에서 黃柏藥鍼이關節炎증의 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998;15(1): 229-248.
11. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 생쥐의 LPS誘發關節炎의 細胞性免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1999;16(3):287-318.
12. 장준혁, 김갑성, 김철호. 黃柏 및 威靈仙藥鍼이 Lipopolysaccharide 유발關節炎의 IL-1 β 발현 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(1): 511-531.
13. 이준호, 이병렬. 澤蘭藥鍼이 collagen으로 유발시킨關節炎에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000;17(1):287-318.
14. 성은미, 이병렬. 赤芍藥鍼이關節炎에 미치는 實驗的 研究. 대한침구학회지. 2000;17(1): 221-250.
15. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 LPS誘發關節炎의 免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001;18(1):100-112.
16. 정경연, 김갑성, 윤중화. 牛黃·熊膽·麝香 複合藥劑 藥鍼刺戟이 LPS유발關節炎의 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(1): 113-128.
17. 나창수, 김정상, 권오섭, 황우준. 흰쥐의關節炎에 미치는 熊膽·牛黃과 猪膽·牛黃 藥鍼의 효능 비교. 대한침구학회지. 1999;16(1):533- 547.
18. 徐富一, 卞晟禧, 金先熙. 全蝎에 關한 考察. 慶山大學校 濟韓東醫學術院 論文集. 1996;1(1): 146- 160.
19. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海:上海科學技術出版社.

- 1981:71-132.
20. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*. 2001;90:271-280.
 21. Kubo M, Matsuda H, Tanaka M, Kimura Y, Okuda H, Higashino M, Tani T, Namba K, Arichi S. Studies on *Scutellariae Radix*. VII. Anti-arthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoid components from *Scutellariae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 1984;32:2724-2729.
 22. 남경수, 배운수, 남명수, 오은숙, 박순희, 최인성, 정태화. Anti-IL-1 β 단일클론항체를 이용해서 발열 환자의 뇨중 IL-1 β inhibitor의 확인. *약학회지*. 1993;37:420-426.
 23. Nam KS, Yang JH, Choi MJ, Choi I, Kim CH, Moon JO. Effective production and clinical application of anti-interleukin-6 monoclonal antibodies. *Korean Journal of Immunology*. 1998;20:289-294.
 24. Sharma SA, Tummuru MR, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infection and Immunity*. 1995;63:1681-1687.
 25. Kim CD, Kim HH, Hong KW. Inhibitory effect of rebamipide on the neutrophil adherence stimulated by conditioned media from *Helicobacter pylori* infected gastric epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 1999;288:133-138.
 26. Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label. An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* 1985;57:1170-1173.
 27. 손정원, 김병호, 정동준, 라성민, 류충근. 류마티스 관절에서 유래된 B-림프구선의 항체 경사슬 가변부 유전자에 관한 연구. *대한면역학회지*. 1995;17(1):65-72.
 28. 權宰植 篇. 痺證. 서울:정담출판사. 1993:23-29.
 29. 樓英. 醫學綱目. 北京:中國中醫藥出版社. 1986:164-165.
 30. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:大星文化社. 1986:164-165.
 31. 최홍식, 권오성, 이준희, 강윤호. 역절풍에 관한 연구. *한의학연구소논문집*. 1996;5:97-129.
 32. Hadjipetrou-Kourounakis L, Yiangou. Bee venom, adjuvant induced disease and interleukin production. *J. rheumatol.* 1988;15(7):1126-1128.
 33. 오상근, 윤태현. 류마치스성 관절염에 대한 조직학적 연구. *대한정형외과학회지*. 1981;16(3):528-538.
 34. Sato K. 骨·軟骨とサイトカイン. 東京:實驗醫學. 1989;7,19-23.
 35. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 篇. 鍼灸學 上. 서울:集文堂. 1988:382-383.
 36. Dayer JM, Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;77:645-648.
 37. Okumoto H, Matsuda T, Turner M. The synovial expression and serum level of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor and oncostatin in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;40:1096-1105