봉독약침이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향

김용문* · 김순중 · 서일복[1]

세명대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, 1 : 해부학교실

Effects of Bee-venom Treatment on the Monosodium iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats

Yong Mun Kim*, Soon Joong Kim, Il Bok Seo[1]

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, 1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Semyung University

This study was to investigate the effects of Bee-venom Treatment on the monosodium iodoacetate(MIA)- induced osteoarthritis in rats. Arthritis was induced by injection of MIA(0.5 ㎎) into knee joints of rats. Arthritic rats were divided into control(n=8) and treated(n=8) group. Control group was injected with normal saline once a day for 20 days, while treated group was injected with Bee-venom extract once a day for same duration. Body weights were measured at 0, 5, 10, 15, 20 days after injection. At the end of experiment, gross and histopathological examination on the articular cartilages of the knee joints were performed. Proteoglycan contents of articular cartilages were analysed by safranine O staining method. The contents of TNF-α, IL-1β and IL-6 in synovial fluids were analysed by ELISA method. And also, COX-2 and iNOS immunohistochemical examination on the knee joints were performed. Body weights of the treated group were increased compared with control group at 20 days after injection. Grossly, the severity of osteoarthritis in the treated group were alleviated compared with control group. PG contents in articular cartilages of the treated group were significantly increased compared with control group. Histopathologically, degenerative and necrotic lesion of articular cartilages in the treated group were alleviated compared with those of the control group. TNF-α contents in synovial fluids of the treated group were decreased compared with control group. Positive reactions of COX-2 in chondrocytes and synovial membranes of the treated group were decreased compared with the control group. On the basis of these results, we concluded that Bee-venom treatment has anti-arthritic effects on the monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. And it's effects were related with reduced secretion of TNF-α and COX-2 from osteoarthritic chondrocytes and synovial membranes.

Key words : Bee-venom, monosodium iodoacetate, osteoarthritis, TNF-α, COX-2

서 론

골관절염은 연골세포 대사의 변화와 함께 관절연골에 부하되는 물리적 압력 증가 등의 원인으로 관절연골이 점진적으로 손상되어 관절연골의 미란(erosion), 연골하골의 경화, 관절 주위 골의 과잉 형성, 관절의 변형 등을 특징으로 하는 퇴행성 관절질환이다[1].

골관절염은 방사선 소견상 55세 이상의 약 80%, 75세 이상에서 거의 전 인구가 이환되어 있고 이 중 1/4 정도에서 임상 증세가 나타나는 가장 흔한 형태의 관절 질환이다[2]. 서양의학에서는 재활 치료, 약물 치료 등의 보존적인 치료 방법과 수술적인 방법이 시행되고 있으나[1], 만성적이고 진행성인 질환의 특성상 통증 조절이나 관리가 어려운 실정이다[3].

蜂毒藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출, 가공한 후 질병과 유관한 부위 및 穴位에 주입함으로써 자침 효과와 蜂毒의 생화학적 약리 작용을 동시에 이용하여 생체의 기능을

* 교신저자 : 김용문, 서울 금천구 북상3동 901-7 지오프라자 301 세종한의원

· E-mail : sejongomc@naver.com, · Tel : 02-866-1133

· 접수 : 2007/08/06 · 채택 : 2007/09/11

조정하고 병리상태를 개선시켜 질환을 치료하거나 예방하는 新鍼療法의 일종이다[4]. 동양에서는 약 2000년 전부터 민간요법의 형태로 각종 동통질환에 응용되어 왔으며[5], 현재까지 관절염 치료에 관한 실험 및 임상연구가 많이 이루어지고 있다[6].

골관절염에 대한 봉독약침의 효과에 관한 한의학적 임상연구로는 왕[7], 원[8], 류[9], 안[10], 최[11]의 연구가 있었으며 모두 골관절염에 대하여 봉독이 유의한 치료효과를 지니고 있다고 보고하고, 박[12]의 실험연구에서 봉독약침이 monosodium iodoacetate (MIA) 유발 골관절염 모델의 중추신경내 통증관련 신경전달물질 감소효과를 보고한 바가 있다.

이에 본 연구에서는 monosodium iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염 통증 모델에서 봉독약침 시술에 따른 체중변화, 육안소견, 병리조직학적소견, 관절연골의 proteoglycan (PG) 함유율 측정, 활액내 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6(IL-6) 등의 함량측정 및 COX-2와 iNOS의 면역조직화학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 180 g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 항온항습사육장치(대종기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다.

2. 골관절염 유발

골관절염 모델은 Janusz 등[13] 의 방법에 준하여 유발하였다. 실험개시일에 monosodium iodoacetate(MIA)를 주사용 saline에 10 ㎎/㎖ 농도로 용해하여 양측 슬관절강내로 각각 0.05 ㎖를 주입하여 골관절염 모델을 작성하였다.

3. 봉독약침액 및 주입기

1) 봉독약침액

봉독원액은 마이크로칩을 이용한 전자파 발생장치로 벌을 자극하여 유리판에 채취한 봉독액을 증류수에 녹여 정제한 후 동결건조기로 수분을 제거하여 얻어진 봉독 분말을 생리식염수에 4000:1로 희석하여 사용하였다.

2) 주입기

봉독약침액 및 생리식염수 주입시에 1.0 ㎖ 1회용 주사기(주사침 26G, 1/2 in., 화진양행, 한국)를 사용하였다.

4. 실험군의 분류

실험개시일에 체중을 측정하여 각 군당 체중이 고르게 8마리씩을 배정한 후 아래와 같은 처치를 하였다.

정상군(Normal Group) : saline 0.05 ㎖를 양측 슬관절 강내에 주사하고 20일간 1일 1회 saline 0.1 ㎖를 양측 슬관절 피하(犢鼻;ST3514))에 주사하였다.

대조군(Control Group) : MIA 0.05 ㎖를 양측 슬관절 강내에 주사하고 20일간 1일 1회 saline 0.1 ㎖를 양측 슬관절 피하(犢鼻;ST35)에 주사하여 골관절염 통증 모델을 작성하였다.

처치군(Treated Group) : MIA 0.05 ㎖를 양측 슬관절 강내에 주사하고 20일간 1일 1회 봉독약침액 0.1 ㎖를 양측 슬관절 피하(犢鼻;ST35)에 주사하였다.

5. 검사 항목 및 방법

1) 체중의 측정

실험개시일, 실험 5일, 10일, 15일, 20일(실험종료일)에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

2) 표본의 처리

실험 종료일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시킨 상태에서 심장채혈하고 원심하여 혈청을 분리하였다.

심장채혈 직후에 우측 슬관절을 적출하였다. 적출된 슬관절 강내에 동일 개체에서 분리된 혈청 0.1 ㎖를 주입하여 세정하고, 슬관절강을 노출시켜 원심하여 활액을 채취하였으며 검사전까지 -70℃에서 냉동보관하였다. 원심에 사용된 우측 슬관절은 10% 중성포르마린액에 24시간 후고정하여 관절의 육안 관찰에 사용하였다.

심장채혈 후 4% paraformaldehyde 액으로 전신을 관류고정하고 좌측 슬관절을 적출하여 10% 중성포르마린액에 24시간 후고정한 후 병리조직학적 검사에 사용하였다.

3) 육안 관찰

고정된 우측 경골 근위단 관절연골 주변을 깨끗이 정리하고 사진촬영하여 육안적으로 관절연골표면의 손상정도를 확인하였다.

4) 관절연골의 proteoglycan(PG) 함유율 측정

적출하여 후고정된 슬관절을 20% formic acid 용액에 3일간 침지하여 탈회시킨 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 슬관절 절단면을 파라핀 포매하고 5 ㎛ 두께의 박절편을 제작하였다.

슬관절의 관절연골내 PG의 변성을 확인하기 위하여 박절편된 표본을 Safranine O 염색하였다. 염색된 관절연골을 100배 시야에서 촬영한 후 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 관절연골에서의 투과도를 측정하였다. 정상군에서 측정된 투과도의 평균을 100%로 기준하고, 대조군과 처치군의 투과도를 환산하여 PG 함유율을 측정하였다.

5) 병리조직학적 검사

슬관절 파라핀 포매 박절편을 Hematoxylin & Eosin 염색하여 광학현미경으로 관절연골 및 활막의 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

6) 활액내 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 함량 측정

활액내 TNF-α 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 1시간, biotinylated antibody reagent는 2시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)

로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6단계의 TNF-α 표준액(2500, 833, 278, 93, 31, 0 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로 부터 회귀방정식 {TNF-α 함량 = (1576 x 흡광도) - 13} 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 TNF-α의 농도를 구하였다.

7) 활액내 interleukin-1β(IL-1β) 함량 측정

활액내 IL-1β 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 30분간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514 , USA)로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6단계의 IL-1β 표준액(2500, 1000, 400, 160, 26, 0 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로 부터 회귀방정식 {IL-1β 함량 = (1761 × 흡광도) + 3 } 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 IL-1β의 농도를 구하였다.

8) 활액내 interleukin-6(IL-6) 함량 측정

활액내 IL-6 함량은 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 1시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8단계의 IL-6 표준액(2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 0 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로 부터 회귀방정식 {IL-6 함량 = (5088 × 흡광도) + 121} 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 IL-6의 농도를 구하였다.

9) COX-2 및 iNOS 면역조직화학적 관찰

조직절편이 염색도중 떨어지는 것을 방지하기 위해서 poly-L-lysine 처리한 슬라이드에 조직절편을 부착하였다. 3% H_2O_2 용액에 30분간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 COX-2 및 iNOS에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

비특이 반응을 억제하기 위해서 조직절편을 일차항체가 제조된 동물의 정상 혈청(3% normal goat serum)으로 30분간 반응시킨 후 가볍게 세척하고 일차 항체를 도포하여 4℃에서 24시간 반응시켰다. 일차항체로 사용된 rabbit polyclonal anti-COX-2 (Cayman Chemical Co., USA)는 1:300배, rabbit polyclonal anti-human-iNOS(Santa Cruz Biotechnology INC., USA)는 1:100배로 각각 희석하여 사용하였다.

일차 항체 반응 후 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG를 상온에서 30분간 반응시키고 ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05M PBS buffer(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 5분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 student's t-test를 실시하여 검증하였다. 유의수준은 $p < 0.05$로 하였고, 모든 측정치는 mean±S.D.로 표시하였다.

결 과

1. 체중의 변화

대조군은 정상군에 비해서 실험 5일부터 실험 20일까지 유의성 있는 체중의 감소를 보였다. 처치군은 실험 5일 및 실험 20일까지 대조군에 비해서 체중이 증가하는 경향을 보였으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 1).

Table 1. Effects of Bee-venom Treatment on the Body Weights of Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Body Weights(g)				
	0	5	10	15	20 days
Normal (n=8)	183±2	226±5	265±6	292±6	314±7
Control (n=8)	185±3	214±10★	246±14★★	275±17★	290±15★★
Treated (n=8)	183±3	217±3	255±8	287±4	297±9

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom, ★ : Statistically significant compared with normal group(★:p(0.05, ★★:p(0.01).

2. 육안 소견

정상군의 경골 근위단 관절연골은 윤기가 있고 매끈한 정상적인 표면의 구조를 나타냈다(Fig. 1-A). 대조군은 전반적으로 관절연골표면이 거칠고 윤기가 없었으며 표면의 중심부는 변색되어 있었고 부위에 따라서는 표면의 탈락이 관찰되었다(Fig. 1-B). 처치군은 대조군에 비해 서 표면의 윤기가 증가되었으며 변색된 범위도 줄어들어 있었다(Fig. 1-C).

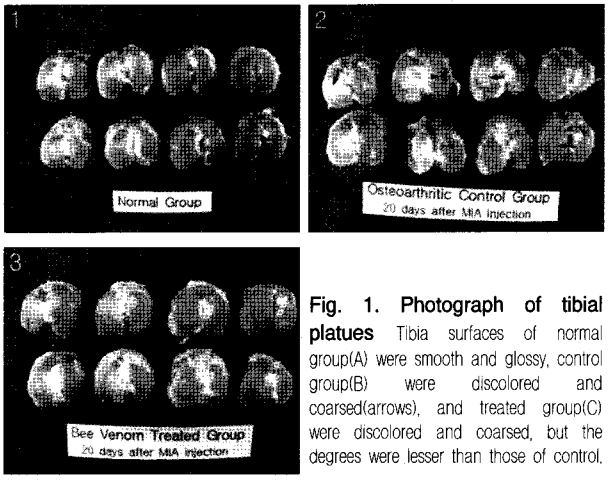

Fig. 1. Photograph of tibial platues Tibia surfaces of normal group(A) were smooth and glossy, control group(B) were discolored and coarsed(arrows), and treated group(C) were discolored and coarsed, but the degrees were lesser than those of control.

3. 관절연골의 proteoglycan(PG) 함유율

칼라영상분석기를 통해서 측정된 각 군에서의 관절연골내 PG 함유율은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있는 현저한 감

소를 나타냈다. 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다(Table 2).

Table 2. Effects of Bee-venom Treatment on the Proteoglycan Contents of Knee Joint Articular Cartilages of Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Proteoglycan Contents(%)
Normal (n=8)	100±10
Control (n=8)	19±3★★★
Treated (n=8)	30±4###

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom, ★ : Statistically significant compared with normal group(★★★:p<0.001), # : Statistically significant compared with control group(###:p<0.001).

4. 병리조직학적 소견

Saline 만을 슬관절강내에 주입한 정상군에서는 슬관절을 구성하는 관절연골 및 활막이 모두 정상적인 범위의 소견만이 관찰되었다(Fig. 2-A). MIA를 슬관절강내에 주입한 대조군에서는 슬관절을 구성하는 대퇴골 관절연골, 경골 관절연골 및 슬개골 관절연골의 대부분이 변성 및 괴사되어 연골세포의 형태가 사라지고 연골층이 균질한 형태를 나타냈으며(Fig. 2-B), 변성괴사된 연골의 주변 연골에는 핵이 농염된 연골세포가 밀집되어 있었다. 또한 많은 부위에서 변성된 관절연골이 탈락되고 관절연골하 골조직이 관절강으로 노출되어 있었다(Fig. 2-C). 활막은 활막세포의 증식으로 인하여 비후되어 있었으며 만성염증세포가 침윤되어 있었다. 처치군에서의 관절연골의 기본적인 병리조직학적 소견은 대조군과 유사하였으나 변성괴사된 부위가 관절연골의 범위가 감소되어 있었고 연골층의 탈락으로 인한 관절연골하 골조직이 노출된 예는 관찰되지 않았다(Fig. 2-D). 활막에서의 기본적인 병리조직학적 소견은 대조군과 유사하였다.

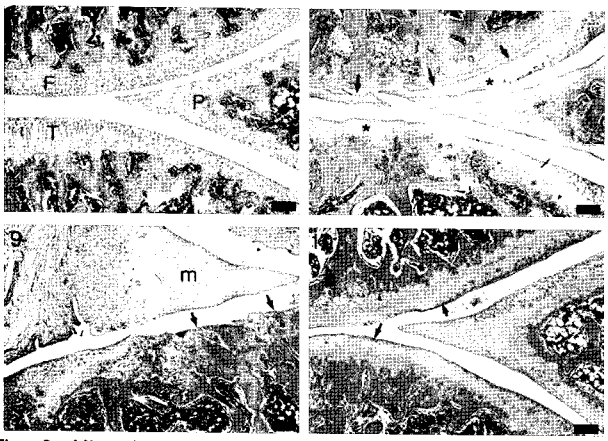

Fig. 2. Microphotograph of knee joint articular cartilages Normal group(A) : Articular cartilages of femur(F), tibia(T) and patella(P) are well developed. control group(B) : Most of articular cartilages were degenerated, and appeared homogenously(*). Note the degenerated articular cartilages exfoliated into joint cavity. Control group(C) : Subchondral bony tissue was exposured (arrows) due to exfoliated articular cartilage. Meniscal cartilage(m) was also degenerated. Treated group(D) : Most of articular cartilages were degenerated, and appeared homogenously. But many chondrocytes(arrows) in degenerated area remained, and exfoliation was not seen. H&E stain, bar = 150 ㎛.

5. 활액내 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 함량

대조군의 TNF-α 함량은 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 처치군의 TNF-α 함량은 대조군에 비해서 감소하였으나 유의성은 확인되지 않았다(Table 3).

Table 3. Effects of Bee-venom Treatment on the Tumor Necrosis Factor-α Contents of Knee joint Synovial Fluids of Monosodium Iodoacetate (MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Tumor Necrosis Factor-α (pg/㎖)
Normal (n=8)	26.5±13.4
Control (n=8)	200.6±124.7★★
Treated (n=8)	143.4±87.5

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom, ★ : Statistically significant compared with normal group(★★:p<0.01).

6. 활액내 interleukin-1β(IL-1β) 함량

대조군 및 처치군의 IL-1β 함량은 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 처치군의 IL-1β 함량은 대조군에 비해서 다소 감소되기는 하였지만 유의한 차이는 없었다(Table 4).

Table 4. Effects of Bee-venom Treatment on the Interleukin-1β Contents of Knee joint Synovial Fluids of Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Interleukin-1β (pg/㎖)
Normal (n=8)	28.1±9.1
Control (n=8)	91.3±19.1★★★
Treated (n=8)	87.4±23.6

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom, ★ : Statistically significant compared with normal group(★★★:p<0.001).

7. 활액내 interleukin-6(IL-6) 함량

대조군의 IL-6 함량은 정상군에 비해서 다소 증가되었으나 유의성 있는 차이는 없었다. 처치군은 대조군에 비해서 미약하게 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effects of Bee-venom Treatment on the Interleukin-6 Contents of Knee joint Synovial Fluids of Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Interleukin-6 (pg/㎖)
Normal (n=8)	23.9±9.8
Control (n=8)	33.6±11.9
Treated (n=8)	34.3±8.6

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom.

8. COX-2 발현

정상군에서 COX-2 양성반응은 대부분의 정상 관절연골세포에서 미약하게 나타났으며(Fig. 3-A), 활막에서는 양성반응이 관찰되지 않았다. 대조군에서 변성괴사되어 균질한 상태를 보인 연골층에서는 양성반응이 나타나지 않았으나, 세포의 윤곽이 남아있는 연골세포에서는 강한 양성반응이 나타났으며, 변성괴사된 연골층의 주변에 밀집되어 있는 연골세포에서도 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3-B). 또한 활막상피층에서는 대조군의 대부분의 예에서 다양한 정도의 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3-C).

처치군에서의 COX-2 양성반응은 대조군에서 양성반응이 관찰된 세포에서 모두 나타났으나 양성반응의 정도가 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다(Fig. 3-D)

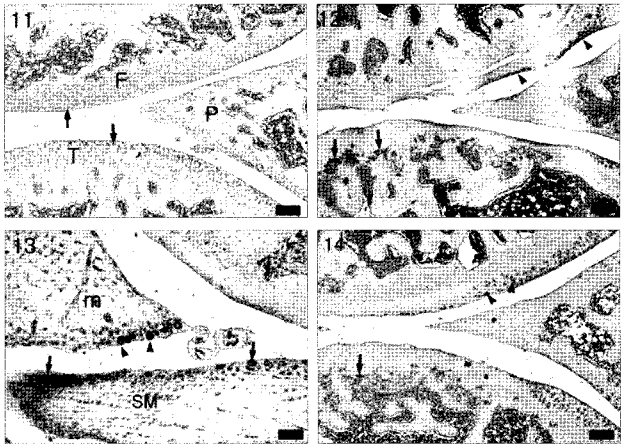

Fig. 3. COX-2 expression of knee joint articular cartilages Normal group(A) : Most of chondrocytes(arrows) of femur (F), tibia(T) and patella(P) are weakly stained with COX-2. Control group(B) : Homogeneous necrotic areas were not stainted, but the chondrocytes at periphery (arrow heads) and deep zone(arrows) of necrotic areas reacted strongly. Control group(C) : COX-2 were also expressed in synovial cells(arrows) and chondrocytes of meniscus (arrow heads). Treated group(D) : COX-2 expressions in the chondrocytes at periphery (arrow heads) and deep zone(arrow) of necrotic areas were lesser than those of control group. Compare with B. COX-2 immunohistochemistry. bar = 150 ㎛.

Table 6. Effects of Bee-venom Treatment on the Expression of COX-2 in Chondrocytes and Synovial Membrane of Monosodium Iodoacetate(MIA)-induced Osteoarthritic Rats

Group	Identification Number	Chondrocytes		Synovial Membrane
		within Necrotic Area	at Periphery of Necrotic Area	
Control	C1	++	++	+
	C2	++	++	++
	C3	+++	+++	+++
	C4	++	++	+
	C5	++	++	+
	C6	+++	+++	-
	C7	++	++	++
	C8	++	+++	+
Treated	T1	++	++	-
	T2	+	+	+
	T3	++	+	+
	T4	++	++	++
	T5	+++	++	+
	T6	+	+++	+
	T7	++	+	++
	T8	+	++	+

Normal : saline injected and treated with saline, Control : MIA injected and treated with saline, Treated : MIA injected and treated with bee-venom, - : negative , + : mild positive, ++ : moderate positive, +++ : strong postive.

9. iNOS 발현

정상군에서 대부분의 관절연골세포에서는 iNOS 양성반응이 관찰되지 않았으며, 활막에서는 양성반응이 없거나 또는 미약한 정도로 관찰되었다(Fig. 4-A).

대조군에서도 변성괴사된 부위 및 주변 연골세포에서는 iNOS 양성반응이 관찰되지 않았으나, 활막상피세포층에서는 모든 예에서 중정도 이상의 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 4-B)

처치군에서의 iNOS 양성반응은 대조군에서와 같이 모든 예의 활막상피세포층에서 중정도 이상의 강한 양성반응이 관찰되어(Fig. 4-C) 처치군과 대조군간의 양성반응의 정도는 유사한 것으로 확인되었다.

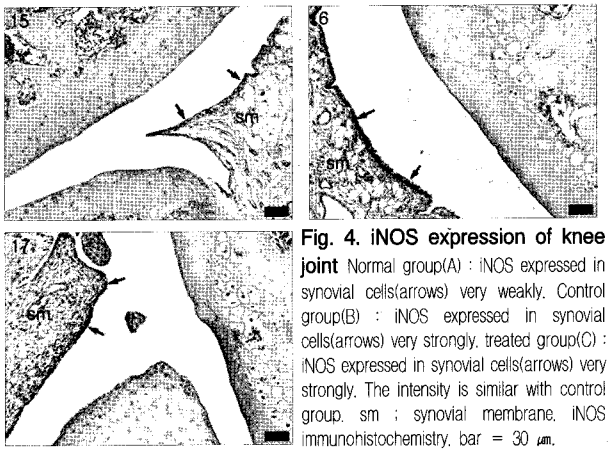

Fig. 4. iNOS expression of knee joint Normal group(A) : iNOS expressed in synovial cells(arrows) very weakly. Control group(B) : iNOS expressed in synovial cells(arrows) very strongly. treated group(C) : iNOS expressed in synovial cells(arrows) very strongly. The intensity is similar with control group. sm : synovial membrane. iNOS immunohistochemistry. bar = 30 ㎛.

고 찰

골관절염은 가장 흔한 관절질환으로 초기에는 연골세포에 가해지는 물리적 장력을 이기기 위해 연골세포의 분열과 대사활성이 증가되어 collagen과 proteoglycan의 생산이 증가된다. 이것은 연골의 비후로 나타나며 이러한 보상성 기전들이 관절의 기능을 수년 동안 잘 유지시켜주게 된다. 그러나 기계적 스트레스가 지속적으로 전달되면 연골세포에 역학적 및 생화학적 변화가 가해짐으로써 proteoglycan 합성의 저하와 교원질대사에 변화가 초래되어 결과적으로 관절연골 표면의 변성 및 탈락이 나타나고 연골하골의 경화 및 골극 형성을 야기한다[15,16].

골관절염 치료에 있어서 서양의학에서는 소염진통제, 연골보호제와 약물주사요법, 병변부위의 외과적 절제 및 재건술, 관절치환술 등이 시행되고 있다. 그러나 외과적인 관절성형술, 관절경 미세천공술 등으로 연골 수복을 기대하고 있으나 수복된 섬유연골 반흔조직들이 생역학적으로 불완전하여 추적관찰시 관절연골이 더욱 손상되고 관절염이 진행되는 보고들이 있고[17,18], glucosamine sulfate, condroitin sulfate, hyalunonate 등의 치료제에 대해서는 그 효능에 대한 검증이 충분히 이루어지고 있지 않았으며[19], 소염진통제의 경우는 장기간 복용시 위장관의 부작용을 일으킬 우려가 있고[20], glycosaminoglycan 합성율을 오히려 감소시켜 관절염의 진행을 가속시킨다는 보고[21]가 있어, 골관절염에 대한 보다 안전하고 효과적인 치료가 필요한 실정이다.

韓醫學에서 골관절염은 痺證에 속하며 이는 風寒濕熱의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 腠理空疎 혹은 正氣虛弱을 틈타 經絡으로 침입하거나 關節에 응체됨으로써 血氣運行을 저해하여 筋骨, 肌肉, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利의 증상을 초래하는 것으로 여겨지고 있다[22].

치료시에는 正氣가 衰하였을 때 外邪의 침입으로 발병하여 虛實이 공존하므로 먼저 병증의 主次와 新舊 및 病位의 所在, 正氣의 盛衰, 邪氣의 성질 등을 종합적으로 판단하여 標本緩急과 扶正祛邪를 염두에 두어[23] 祛風勝濕, 溫經通絡, 消腫止痛하는 방법으로 치료하며[24], 주로 침구요법 및 약물요법이 다용되고 있으나, 근래에는 각종 동통, 염증성 질환에 유효하다고 알려진 蜂毒藥鍼療法에 대한 관심이 높아지고 있으며 이에 대한 많은 임상

및 실험적 결과가 보고되고 있다[7].

蜂毒藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 추출, 가공한 후 질병과 유관한 부위 및 穴位에 주입함으로써 자침 효과와 蜂毒의 생화학적 약리 작용을 동시에 이용하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질환을 치료하거나 예방하는 新鍼療法의 일종으로[5], 蜂毒의 性味는 苦·辛·平·有毒하여 祛風除濕, 止疼痛, 補益精氣, 消腫降壓의 효능이 있으며[25], 동양에서는 약 2000년 전부터 민간요법의 형태로 각종 동통질환에 응용되어 왔다[6].

봉독의 주요 성분은 약 40여 가지로 peptide, enzymes, amines, lipids, carbohydrates 및 amino acids 등으로 나누어지며, 이 중 중요한 역할을 하는 peptide는 건조 봉독의 50~60%를 차지하고, 그 중 melittin (40~50%), apamin(2~3%)과 acolapin(1%)이 차지한다. 이 중 melittin은 봉독의 주성분으로 용혈, 효소, 항염 작용이 있고, apamin과 MCD(mast cell degranulation) peptide는 면역기능을 증가시키며, 진통과 소염작용을 나타내고, 백혈구의 식작용을 억제하며, 혈장의 섬유화를 저하시키는 효능이 있으며[25], 지금까지 다양한 연구를 통해 봉독이 진통, 소염, 진경, 항암, 면역증강, 순환촉진, 항균, 방사능저항성작용의 효능이 있다고 알려졌다[26].

골관절염에 대한 연구모델로는 외과적으로 슬십자인대 또는 슬관절 반월판을 손상시키거나, 슬관절강내로 papain을 투여하거나 collagenase를 투여하여 골관절염을 유발한 병태모델 등이 이용되어져 왔다[27]. 본 연구에 사용된 monosodium iodoacetate (MIA)는 관절강내에 주입시 관절연골세포에서 진행되는 해당과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여, 관절연골의 대사과정을 저해시키고, 관절연골의 변성을 일으켜 골관절염을 유발시키는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발 실험에서 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등의 양상이 사람의 골관절염과 매우 유사하다고 보고되었다[13,28].

이에 저자는 봉독약침이 MIA로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향을 확인하기 위해서 MIA를 양측 슬관절강내 주입한 대조군, MIA 주입과 함께 봉독약침을 20일간 양측 슬관절 피하에(犢鼻;ST35)에 주사한 처치군으로 분류하고 슬관절의 육안 및 병리조직학적 관찰, 관절연골내 proteoglycan 함유율 측정, 활액내 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 함량측정, 슬관절의 COX-2 및 iNOS 면역조직화학을 실시하였다.

육안 소견에서 대조군의 관절연골표면이 거칠고 윤기가 없었으며 표면 중심부의 변색 및 관절연골의 탈락이 관찰되어 MIA의 관절강내 투여로 인해 골관절염이 유발되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 처치군에서는 대조군에 비해 관절연골의 변성 및 미란의 정도가 완화되어 있었다(Fig. 3). 병리학적 소견상에서는 대조군에서 슬관절을 이루는 관절연골의 변성 및 괴사, 관절연골의 탈락, 관절연골하 골조직이 관절강으로 노출이 나타난 반면(Fig. 1-A, B), 처치군에서는 변성괴사된 관절연골의 범위가 감소되어 있었고 연골층의 탈락으로 인한 관절연골하 골조직의 노출은 관찰되지 않았다(Fig. 1-C). 이 결과로 보아 봉독약침은 MIA 유발 골관절염의 진행을 억제한다고 할 수 있다.

체중의 변화는 MIA를 주사후 대조군 및 처치군에서 모두 정상군에 비해 실험 5일부터 실험 20일까지 유의성 있는 체중의 감소를 보였고, 처치군은 대조군에 비해서 체중의 증가 경향을 나타냈다(Table 1). 이는 봉독약침이 골관절염으로 인한 통증, 활동력 저하와 이로 인한 식욕감소 등의 증상들을 개선시킴으로써 부분적인 체중증가를 가져 온 것으로 볼 수 있다.

Proteoglycan은 탄수화물 부분이 주로 glycosaminoglycan인 당 단백질의 한 부류로서 그 구성요소를 통하거나 폴리펩티드 그 자체에 있는 특수 수용체 영역을 통해 세포외 기질의 구성 요소를 연결해주고, 세포가 기질에 결합하는 것을 촉진시키며, 성장인자와 다른 수용성 분자들이 세포외 기질이나 세포 표면에 결합하는 것을 중개하는 역할을 한다[29]. 특히 연골의 기질에 존재하는 proteoglycan은 우리 몸에 있는 연골조직의 유연성과 탄력성의 원인이 되는데, 연골의 proteoglycan은 폴리펩티드의 NH^{2-} 말단부분에 hyaluronic acid 결합영역을 가지고 있으며, 연결 단백질의 도움으로 hyaluronic acid와 결합한다. Proteoglycan-hyaluronic acid 응집체는 불분자와 다중 양이온 복합체간의 강한 상호작용으로 고도로 수화되는데, 연골이 압축되었을 때, 물이 연골조직에서 빠져나오고 그 충격이 없어지면 다시 재흡수된다. 이러한 가역적인 수화반응 때문에, 연골이 유연하고 충격을 흡수하는 특성을 가지고, 육체적인 활동 동안 관절의 완충작용을 가능하게 하며, 관절표면에 proteoglycan membrane을 형성하여 관절면을 보전하게 된다. 또한 proteoglycan은 관절의 운동으로 발생되는 삼투압으로 인해 관절연골의 영양공급과정의 중앙부 역할을 하여 활액세포 및 활액이 기질의 proteoglycan을 경유하여 연골 세포에 영양을 공급하게 된다[29,30].

본 연구에서 측정된 관절연골내 PG함유율은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소되었으며 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가 되었다(Table 2). 이는 봉독약침이 골관절염의 진행에 있어서 관절연골내 proteoglycan의 파괴를 억제하는 데 효과가 있음을 보여주는 것이다.

IL-1은 가장 처음 기록된 cytockine의 하나로 IL-1α, IL-1β와 IL-1 receptor antagonist의 3종류가 있다[31]. 이 중 IL-1β는 연골세포, 활액, 활막세포로부터 collagenase, stromelysin, gelatinase 등의 matrix metalloproteinases (MMPs)의 생성과 분비를 촉진시켜 연골 기질의 파괴를 증가시키며 또한 prostaglandin E2의 생성을 촉진시켜 연골 기질로부터 proteoglycan의 소실율을 증가시키고 재합성을 억제하여 기질성분의 상실을 충분히 보충하지 못하게 한다[2,32].

본 연구에서 활액내 IL-1β 함량 변화를 측정한 결과 정상군에 비해 대조군의 유의성 있는 증가가 나타났고, 처치군에서는 대조군에 비해 감소되기는 하였지만 유의한 차이는 없었다(Table 4). 이러한 결과는 MIA 유발 골관절염의 병리 발생에서 활액내 IL-1β 분비는 주된 요인으로 작용됨을 확인할 수 있었으나, 봉독약침은 IL-1β 분비를 억제시키는 효과가 뚜렷하지 않음을 보여준다.

IL-6은 여러 가지 생물학적 활성을 가지는 다면적인 cytockine의 하나로 IL-1이나 TNF와는 달리 조직 파괴에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 metalloprotease의 억제제의 생산을 유도할

수 있기 때문에 feedback 기전에서 중요한 역할을 할 수 있다. IL-6은 IL-1과 TNF-α에 의해 분비가 촉진되어 골관절의 염증반응에 주된 매개 작용을 하고, 혈청 및 관절염으로 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가하여, 관절염의 활성도와 연관성이 있다고 알려져 있다[33,34]. 특히 IL-6는 골관절염보다 류마토이드 관절염의 염증반응에서 활성도가 증가한다고 보고되고 있다[35].

본 연구에서 IL-6 함량 변화를 측정한 결과 대조군에서 정상군에 비해 다소 증가되었으나 유의성 있는 차이는 없었고, 처치군과 대조군간에서도 유의성 있는 차이는 없었다(Table 5). 이는 IL-6이 류마토이드 관절염 또는 골관절의 급성 염증에 반응하는데 비해 MIA 유발 골관절염 모델에서는 큰 연관이 없다고 보여진다.

TNF(tumor necrosis factor)는 중요한 염증성 전구 cytokine으로서 활성화된 monocyte와 macrophage에 의하여 생산되며, 세포손상, shock, apoptosis와 같은 다양한 생물학적 반응을 유도한다[36]. TNF-α는 T세포와 다른 염증 세포 활성과 IL-1, IL-6, IL-10과 같은 cytokine의 분비를 유도하며[37], 골관절염에서 TNF-α의 작용은 IL-1과 유사하여 관절연골기질로부터 proteoglycan 소실의 증가와 재합성 억제를 통해 관절연골을 손상시키고 골관절염의 진행을 유도한다[2].

본 연구에서 TNF-α 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가 되었고, 처치군의 TNF-α 함량은 대조군에 비해서 상당히 감소되었으나 유의성은 확인되지 않았다(Table 3). 이는 MIA로 유발된 관절염에서 관절연골 손상과 염증으로 인한 병리적 상황이 봉독약침으로 인해 완화된 결과이며, PG의 손상정도와 COX-2 양성반응의 감소의 결과를 볼 때 연구기간의 연장과 보다 많은 실험개체 수의 확보가 이루어진다면 유의성 있는 감소가 있을 것으로 생각된다.

NO는 각종 조직에 존재하는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된되는데, 포유류의 조직내에서는 신경세포에 주로 존재하는 neural NOS(nNOS), 대식세포, 별아교세포 및 미세아교세포 등에 존재하는 inducible NOS(iNOS), 혈관내피세포에 주로 존재하는 endothelial NOS(eNOS)가 존재하며[38], 이 중 iNOS는 세균 감염이나, 세균내독소와 같은 염증성 자극과 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), 그리고 interferon-γ(INF-γ)와 같은 염증성 cytokine들에 의해 대식세포와 다핵형 백혈구를 포함한 다양한 세포에서 발현 된다[39]. 골관절염에서 NO는 TNF-α, IL-1β와 함께 관절연골의 이화작용에 관여하여 연골을 손상시킨다[1].

본 연구에서 iNOS 발현의 관찰결과 대조군에서는 변성괴사된 부위 및 주변 연골세포에서는 iNOS 양성반응이 관찰되지 않았으나, 활막상피세포층에서는 모든 예에서 중등도 이상의 강한 양성반응이 관찰되었고(Fig. 4-B), 처치군에서의 iNOS 양성반응은 대조군과 유사하게 관찰되었다Fig. 4-C). 이러한 결과로 보아 MIA 유발 골관절염의 병리발생에서 활막세포에서의 iNOS 분비는 주된 요인으로 작용됨을 확인할 수 있었으나, 봉독약침은 iNOS 분비를 억제 시키지는 못한다고 생각된다.

Cyclooxygenase(COX)에는 COX-1과 COX-2의 두 가지의 isoform이 있는데, COX-1과 COX-2는 구조상으로는 60%의 동일한 구조를 가지나 기능은 판이하게 다르다. COX-1은 여러 조직에서 상존형으로 존재하면서 위점막 보호, 신장 혈류조절, 혈소판 응집의 작용과 신체 기능의 항상성을 유지시키는 역할을 하고, COX-2는 유도형 효소(induced enzyme)로서 염증반응, 성장 촉진 인자, cytokine 신호 등의 자극에 유도되어 염증부위에 arachidonic acid 대사물질 생성이 증가할 때 prostaglandin의 합성을 매개한다. 골관절염에서는 특히 prostaglandin E2의 생성이 증가하여 골관절염의 증상을 야기하는데 많은 관련이 있고, COX-2 억제가 항염증 작용과 진통작용을 나타낸다고 보고되었다[2,21,40].

본 연구에서 COX-2 양성반응의 관찰한 결과, 대조군에서는 변성 괴사되어 균질한 상태를 보인 연골층에서는 COX-2 양성반응이 나타나지 않았으나, 세포의 윤곽이 남아있는 연골세포와 변성 괴사된 연골층의 주변에 밀집되어 있는 연골세포에서는 강한 양성반응이 관찰되었고(Fig. 3-B), 활막상피층에서는 대조군의 대부분의 예에서 다양한 정도의 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3-C). 처치군에서의 COX-2 양성반응은 대조군에서 양성반응이 관찰된 세포에서 모두 나타났으나 양성반응의 정도가 대조군에 비해서 미약하게 관찰되어(Fig. 3-D) 봉독약침으로 인해 COX-2가 억제되어 골관절염의 항염증 작용 및 진통작용에 효과가 있다고 할 수 있다.

이상의 결과는 봉독약침이 흰쥐의 MIA 유발 골관절염의 발생에서 연골세포 및 활막세포의 TNF-α 및 COX-2의 분비를 억제시켜 골관절염 발생시 기질내 PG의 파괴를 저하시키고 골관절염의 진행을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 앞으로 봉독약침의 횟수와 농도 및 용량에 관한 연구와 골관절염에 대한 임상적인 연구가 이루어진다면 골관절염 치료와 예방에 널리 활용될 수 있으리라 사료된다.

결 론

봉독약침이 흰쥐의 MIA로 유발된 골관절염에 미치는 영향을 확인하기 위해서 본 연구를 수행하였다. 체중 185 g 내외의 수컷 흰쥐에 MIA 0.5 ㎎을 슬관절강내에 주입하여 골관절염을 유발시킨 대조군, MIA 주입과 더불어 봉독약침을 슬관절 피하에(犢鼻;ST35) 주사한 처치군으로 분류하였다. 실험기간동안 체중을 측정하였으며, 실험 20일에 부검하여 슬관절의 육안 및 병리조직학적 관찰, 관절연골내 proteoglycan 함유율 측정, 활액내 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 함량 측정, 슬관절의 COX-2 및 iNOS 면역조직화학을 실시하였다

체중(g)은 실험 20일에 처치군(297±9)이 대조군(290±15)보다 증가되었다. 육안적으로 처치군의 골관절염의 정도는 대조군에 비해서 완화되어 있었다. 관절연골내 proteoglycan 함유율(%)은 처치군(30±4)이 대조군(19±3)보다 유의성($p<0.001$) 있게 증가되었다. 병리조직학적으로 관절연골의 변성, 괴사 및 탈락의 소견은 처치군이 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다. 활액내 TNF-α 함량(pg/㎖)은 처치군(143.4±87.5)이 대조군(200.6±124.7)보다 감소되었다. 관절조직내 COX-2 양성반응은 처치군이 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해보면 봉독약침은 흰쥐의 MIA 유발 골관절염의 병리발생에서 연골세포 및 활막세포의 TNF-α 및 COX-2의 분비를 억제시켜 골관절염의 진행을 억제시키는 효과가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. 김진호, 한태륜. 재활의학. 서울, 군자출판사, pp 501-524, 2006.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울, 최신의학사, pp 195-201, 2005.
3. 김현아. 퇴행성 관절염의 임상 연구. 대한 류마티스학회지 7(3):205-211, 2000.
4. 권기록, 고형균, 김창환. 봉침에 대한 고찰. 대한침구학회지 11(1):159-171, 1994.
5. 인창식, 고형균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌 : 마황퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지 15(1):143-147, 1998.
6. 정인태, 백용현, 박동석, 최도영. 봉독약침이 Collagen 유발 관절염에 미치는 진통효과 및 그 기전 연구. 대한침구학회지 22(1):99-108, 2005.
7. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적 관찰. 대한침구학회지 18(3):35-47, 2001.
8. 원중희, 최의성, 홍성선. 골관절염 환자에서 봉독주사액의 효과. 대한류마티스학회지 6(3):218-226, 1999.
9. 류수민, 이종수, 김성수, 정석희. 관절강내 봉독요법이 퇴행성 슬관절염에 미치는 임상적 효과. 한방재활의학과학회지 14(1): 35-52, 2004.
10. 안병준, 김경태, 강미숙, 송호섭. 퇴행성 슬관절염의 봉약침 치료효과. 대한침구학회지 23(4):15-20, 2006.
11. 최근선. 퇴행성 슬관절염에 대한 봉독의 치료 효과. 경희대학교 동서의학대학원, 2006.
12. 박동수. 봉독약침이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 골관절염 통증 모델에서 중추신경내 NOS, C-fos, Serotonin, Substance P 발현에 미치는 영향. 세명대학교 대학원, 2007.
13. Janusz, M.J., Hookfin, E.B., Heitmeyer, S.A., Woessner, J.F., Freemont, A.J., Hoyland, J.A., Brown, K.K., Hsieh, L.C., Almstead, N.G., De, B., Natchus, M.G., Pikul, S., Taiwo, Y.O. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. Osteoarthritis and Cartilage. 9(8):751-760, 2001.
14. 고형균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈위. 대한침구학회지 16(3):115-122, 1999.
15. 해리슨 내과학 편찬위원회 편. 내과학. 서울, 정담, pp 1821-1827, 1997.
16. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 1167-1169, 2003.
17. 최남홍. 연골결손에 대한 자가 골연골 이식술과 재생에 대한 실험적 연구. 대한정형외과학회지 23(2):619-628, 1988.
18. 배대경, 정기웅, 김진문, 권창혁, 박용구. 미세천공술 후 재생된 연골의 면역조직화학적 염색 결과. 대한정형외과연구학회지 3(1):1-4, 2000.
19. 이도영, 문호생, 조규형, 천정은. 슬관절 퇴행성 관절염에 대한 글루코사민의 효과. 대한슬관절학회지 13(1):130-136, 2001.
20. 양창헌. 흔히 접하는 비스테로이드성 항염증약물과 위장관 질환. 동국의학, 10(2):190-199, 2003.
21. Huskisson, E.C., Berry, H., Gishen, P., Jubb, R.W., Whitehead, J. Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis. J Rheumatol. 22(10):1941-1946, 1995.
22. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 서울, 군자출판사, pp 79-97, 2006.
23. 김미려, 허수영, 박기현. 퇴행성 슬관절염에 대한 동서의학적 비교. 제한동의학술연구원 논문집, 4(1):711-722, 1996.
24. 장준혁, 김경호. 슬관절의 퇴행성 관절염에 대한 고찰. 대한침구학회지 15(2):493-509, 1998.
25. 고형균, 권기록, 인창식. 봉독약침요법. 서울, 경희대학교출판국, pp 105-162, 2003.
26. 강준, 송호섭. 봉독약침과 Melittin이 RAW 264.7세포의 NO, iNOS 및 MARK에 미치는 영향. 대한침구학회지 21(3): 107-119, 2004.
27. Kikuchi, T., Sakuta, T., Yamaguchi, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. Osteoarthritis Cartilage. 6(3):177-186, 1998.
28. Guzman, R.E., Evans, M.G., Bove, S., Morenko, B., Kilgore, K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. Toxicol Pathol. 31(6):619-624, 2003.
29. 생화학교재편찬위원회. 생화학. 서울, 정문각. pp 357-363, 2003.
30. 김재도. 관절 연골의 Proteoglycan 생성에 있어서 양이온제가 미치는 영향. 고려대학교대학원, 1990.
31. Dinarello, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J. 8(15):1314-1325, 1994.
32. 진소영, 강성수, 이동화, 임수재, 윤여헌, 이병일. 인체 골관절염의 관절연골에서 matrix metalloproteinase(MMP)-1, MMP-3, Nitrotyrosine 발현과 세포자멸사. 대한병리학회지 35(4):319-329, 2001.
33. Ahmed, S.T., Ivashkiv, L.B. Inhibition of IL-6, IL-10 Signaling and Star Activation by Inflammatory and Stress Pathways. J. Immunol. 165: 5227-5237, 2000.
34. Jacqueline Uson, Alejiandro Balsa. Dorsa Pascal-Salcedo : Soluble IL-6 Receptor and differant Arthropathies, J. Rheumatol. 24: 2069-2075, 1997.
35. Simi T. Ahmed, Lionel B. Ivashkiv. Inhibition of IL-6, IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways. The Journal of Immunology. 165: 5227-5237, 2000.
36. Tracey, K.J., Cerami, A. Tumor necrosis factor in metabolism

of disease: hormonal actions versus local tissue effects. Nouv Rev Fr Hematol. 34 Suppl:S37-42, 1992.

37. Vilcek, J., Lee, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem. 266(12):7313-7316, 1991.
38. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell. 78: 915-918, 1994.
39. Geller, D.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Wang, S.C., Simmons, R.L., Billiar, T.R. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 90(2):522-526, 1993.
40. Anguita, J., Samanta, S., Ananthanarayanan, S.K., Revilla, B., Geba, G.P., Barthold, S.W., Fikrig, E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. FEMS Immunol Med Microbiol. 34(3):187-191, 2002.