

원저

絡石藤약침이 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

이태호 · 이은용

세명대학교 부속충주한방병원 침구과

Abstract

Effect of *Trachelospermi Caulis* Herbal-acupuncture on the Collagen-induced Arthritis in Rats

Lee Tae-ho and Lee Eun-young

Department of Acupuncture & Moxibustion, Chungju Oriental Medical Hospital,
Semyung University

Objectives : This study was built to investigate the effect of *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture on the Collagen-induced arthritis(CIA) in rats.

Methods : Arthritis was induced by intradermal injection of Bovine type II collagen solution into base of tail. Experimental group were divided into 5 groups ; Normal(N) group, Control(C) group, *Trachelospermi Caulis* high(TH) group, *Trachelospermi Caulis* low(TL) group, Saline(S) group(n=7 for each group). Normal group was had no management. Control group was injected with Bovine type II collagen solution and taken no treatment. *Trachelospermi Caulis* high group was injected with Bovine type II collagen solution and taken high-intensity(10mg/kg) herbal-acupuncture treatment on ST₃₆. *Trachelospermi Caulis* low group was injected with Bovine type II collagen solution and taken low-intensity(5mg/kg) herbal-acupuncture treatment on ST₃₆. Saline group was injected with Bovine type II collagen solution and taken saline injection on ST₃₆. Body weight, paw edema volume and ankle joint thickness were measured during experimental day. On the last experimental day, we analyzed WBC count, TNF- α & IL-1 β concentration, c-fos immunohistochemistry and NADPH-d histochemistry for evaluating the effect of *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture.

Results : The results were as follows ;

1. In the change of paw edema volume, TH group only has significant difference compared with C group.
2. In the change of ankle joint thickness, TH group only has significant difference compared with C group.

· 접수 : 2009. 10. 28. · 수정 : 2009. 11. 19. · 채택 : 2009. 11. 21.
· 교신저자 : 이은용, 충북 충주시 봉방동 836번지 세명대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 043-841-1735 E-mail : acupley@semyung.ac.kr

3. In WBC count of serum, TH, TL groups have significant decrease compared with C group.
4. In TNF- α concentration of effusion, TH, TL groups have significant decrease compared with C group. and TH group has significant decrease compared with TL group.
5. In IL-1 β concentration of effusion, TH, TL groups have significant decrease compared with C group. and TH group has significant decrease compared with TL group.
6. In c-fos positive neurons of S1S2(cortex) region, TH, TL, S groups have significant decrease compared with C group.
7. In NADPH-d positive neurons of CPu(caudate putamen) region, TH, TL groups have significant decrease compared with C group.
8. In NADPH-d positive neurons of Tfp(transverse fibers of pons) region, TH, TL, S groups have significant decrease compared with C group. and TH group has significant decrease compared with S group.

Conclusions : According to above results, we hope that *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture may have the effect that decreases progression and development of CIA. And it can be suggested that *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture may reduce the expression of c-fos and NOS.

Key words : Collagen-induced arthritis, *Trachelospermi Caulis*, Herbal-acupuncture, ST₃₆, c-fos, NADPH-d

I. 서 론

류마토이드 관절염은 가동 관절의 활막에 발생하는 전신적인 염증성 질환으로, 현재까지는 정확한 원인이 밝혀지지 않은 자가면역질환이다. 염증반응은 유전적인 선행인자가 있는 사람에게 발생할 가능성이 높으며, 만성적인 염증반응은 활막의 세포 성분과 유전적 표현형을 변화시켜 섬유모세포의 증식과 연골, 뼈, 인대의 구조적 변형을 야기한다¹⁾.

류마토이드 관절염은 전신적인 증상과 대칭적인 관절의 증상이 발현하며, 활막 증식과 육아 조직(pannus)에 의한 관절 변형과 구축이 나타날 수 있고, 중요한 장기의 침범으로 치명적인 상황이 초래될 수 있다²⁾. 유전적 요인과 바이러스 등이 원인 가설로 제시되고 있지만, 아직까지 정확한 연관성은 밝혀지지 않았으며³⁾, 명확한 원인이 없는 상황에서의 치료는 대중적인 수준에 머물고 있는 실정으로 보존적 치료입장에서 증상과 삶의 질 개선에 목적을 두고 다양한 치료법이 연구되고 있다⁴⁻⁶⁾.

한의학적으로는 류마토이드 관절염은痺症 또는歷節風, 鶴膝風 등의 범주에 해당하는 것으로, 風寒濕

熱 또는 痰濁瘀血이 經絡을 阻滯시켜 肢體, 關節, 肌肉에 疼痛, 酸楚, 麻木, 重着이 나타나는 것으로 임상상 점차 악화되거나 반복발작하며, 증상은 流走性의 양상을 보이기도 하며, 관절의 변형과 활동장애 強硬 등을 특징으로 한다⁷⁻⁹⁾.

Collagen induced arthritis(CIA)가 면역 병리조직학적으로 만성 류마토이드 관절염과 유사한 면이 있다고 밝혀진 이후 동물실험에 다용되고 있는데, 양의학에서는 생약복합제, 유전자요법 및 줄기세포요법¹⁰⁻¹²⁾에 관한 연구가 진행되고 있으며, 한의학적으로는 최 등^{13,14)}은 단일약제를, 장 등¹⁵⁾은 복합처방을 이용한 연구를 진행하였고, 침구요법으로 이 등^{16,17)}은 약침을, 류 등^{18,19)}은 전침을 이용한 혈청학, 조직면역학적 연구를 시도하였다.

류마토이드 관절염의 한의학적 치료는 鬱滯된 經絡을 소통하는 것에 일차적인 목표를 두고 通經活絡하는 약제들을 빈용하게 된다. 그 중 絡石藤(*Trachelospermi Caulis*)은 祛風通絡, 涼血消腫, 行瘀止血的 효능으로 瘀血과 風寒濕熱로 인한 痺症의 치료에 널리 사용되나^{20,21)}, 아직까지는 絡石藤에 대한 관절염 실험 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 絡石藤이 류마토이드 관절염에 미치

는 영향을 알아보기 위해 흰쥐에 Collagen으로 족근 관절의 염증을 유발한 후 足三里(ST₃₆)에 絡石藤 약침액을 주입하여 형태계측학적 검사, 혈청 내 WBC 측정, 관절 삼출액의 Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) 측정, 뇌에서의 NADPH 조직화학, c-fos 면역조직화학염색법을 시행하여 관찰한 결과 유의한 소견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

1) 실험동물

실험동물은 체중 200g 내외의 6주령 Wistar Rat (샘타코, Korea) 50마리를 사용하였다. 전 실험기간 동안 충분한 고형사료와 음수를 공급하여 자유 섭취케 했으며, 온도는 20 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50 \pm 5%, 밤낮주기(12시간 light / 12시간 dark)로 조정된 항온항습사육장치가 갖추어진 사육실에서 사육하였다.

2) 약침액의 제조

실험에서 사용한 絡石藤은 (주)한의원통(경기 포천, Korea)에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다. 絡石藤 50g을 1L의 증류수에 넣고 1시간 상온 방치 후 100 $^{\circ}$ C에서 2시간 전탕하고 여과지로 3회 여과하여 700ml의 여과액을 얻었다. 이 여과액에 1,400ml의 95% EtOH을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 보관하여 잡질을 침전시키고, 여과지로 3회 여과하여 얻어진 여과액을 rotary evaporator(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 감압 농축하고 냉장, 여과하였다. 이때 얻어진 160ml의 여과액에 700ml의 95% EtOH을 첨가하고 침전, 여과, 농축, 냉장, 여과의 과정을 반복하고, 다시 이 여과액 25ml에 250ml의 95% EtOH을 첨가하여 침전, 여과, 농축, 냉장, 여과의 과정을 반복한 후 최종적으로 얻어진 20ml의 여과액을 -80 $^{\circ}$ C에서 동결시켰다. freezer dryer system(Labconco, USA)를 이용하여 7일간 동결건조 시키고 최종적으로 2.668g의 분말을 얻었으며, 이를 PBS(pH 7.4)에 용해시켜 0.80 μ m syringe filter(Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 1차 필터링하고, 다시 0.20 μ m syringe filter로 2차 필터링한 후 최종 약침액으로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 관절염의 유발

Bovine type II collagen(Sigma Co, USA)을 0.05 M acetic acid에 6mg/ml의 농도로 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 교반하여 용해하고, N-acetylmuramyl L-alanyl D-isoglutamine(MDP)(Sigma Co, USA)을 증류수에 2mg/ml의 농도로 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 교반하여 용해하였다. 접종 당일에 collagen용액과 MDP용액을 1 : 1로 섞어 혼합하고, 이 용액을 동량의 Freund's incomplete adjuvant(Sigma Co, USA)와 섞어 homogenizer(Bio-spec Products, Tissue Tearor, USA)를 이용하여 현탁액으로 만들었다. 정상군으로 사용할 7마리를 제외한, 43마리의 rat을 대상으로 미근부에 현탁액 0.2ml를 접종하고, 7일 후에 동일한 방법으로 제조한 현탁액 0.1ml를 근부의 피내에 추가 접종하여 관절염을 유발하였다.

2) 실험일정

2차 collagen 접종 2주 후를 실험 시작일(day 0)로 하고, 실험 시작일에 실험군을 분류하여 약침 주입, 체중 측정, 족근 관절폭 및 족부종 측정을 시작하였다. 약침주입은 실험 시작일로부터 2주간 총 9회(day 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14) 시행하였으며, 체중, 족근 관절폭, 족부종 측정은 실험 시작일로부터 2주간 총 7회(day 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14) 시행하였다.

3) 실험군 설정

정상군(n=7)을 제외한 43마리 실험동물의 후지에 관절염을 유발시키고, 관절염 동물 모델 중에 실험 시작일에 좌우 족근 관절(tarsal joint)의 폭을 digital calipper(Mitutoyo, CD-15CP, Japan)를 이용하여 각각 3회 측정하고 좌우의 평균값을 구하여 폭이 9mm 이상인 개체 28마리를 선별하여 무작위로 각 7마리씩 대조군과 고농도 낙석등 약침군, 저농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군에 배정하였다.

- ① 정상군(Normal, N) : 어떠한 처치도 하지 않은 군.
- ② 대조군(Control, C) : collagen만을 접종한 군.
- ③ 고농도 낙석등 약침군(*Trachelospermi Caulis* high, TH) : 실험 시작일부터 실험 종료일까지 총 9회 족삼리 혈에 10mg/kg의 농도로 0.2ml의 약침액을 주입한 군.
- ④ 저농도 낙석등 약침군(*Trachelospermi Caulis* low, TL) : 실험 시작일부터 실험 종료일까지

총 9회 족삼리 혈에 5mg/kg의 농도로 0.2 ml의 약침액을 주입한 군.

- ⑤ 식염수 주입군(Saline, S) : 실험 시작일부터 실험 종료일까지 총 9회 족삼리 혈에 0.2ml의 식염수를 주입한 군.

4) 약침액 주입

대조군은 collagen 점종 이외의 처치는 하지 않았다. 세포 독성 실험상 1,000mg/kg까지 세포 괴사가 일어나지 않아, 고농도 낙석등 약침군, 저농도 낙석등 약침군은 실험 시작일부터 각각 5mg/kg, 10mg/kg 농도의 藥鍼液을 26gauge 주사기(동신메디텍, Korea)를 이용하여 兩側 足三里(ST₃₆)에 총 9회 주입하였다. 식염수 주입군은 실험 시작일부터 Saline 0.2ml를 兩側 足三里에 총 9회 주입하였다. 足三里는 흰쥐의 뒷다리에서 인체의 足三里에 해당하는 부위를 骨度分寸法에 의거하여 취혈하였다.

5) 체중의 측정

실험 시작일부터 실험 종료일까지 총 7회 모든 개체의 체중을 측정하였다.

6) 족부종(paw edema volume)의 측정

실험 시작일부터 실험 종료일까지 총 7회 모든 개체의 좌우 후지의 족부종을 pletysmometer(UGO BASILE, 7141, Italy)를 이용하여 각각 3회 측정하고 좌우의 평균값을 구하였다.

7) 족근관절(tarsal joint)의 폭 측정

실험 시작일부터 실험 종료일까지 총 7회 모든 개체의 좌우 족근관절의 폭을 digital calipper(Mitutoyo, CD-15CP, Japan)를 이용하여 각각 3회 측정하고 좌우의 평균값을 구하였다.

8) 혈청 내 WBC 측정

실험 종료일에 ether 마취하에 모든 개체로부터 심장채혈하고 3,000rpm에서 20분간 원심하여 혈청을 분리하고, 혈청의 분석은 이원의료재단(서울, Korea)에 의뢰하였다.

9) 족관절 삼출액의 Tumor necrosis factor- α 함량 측정

실험 종료일에 rat의 우측 다리 슬관절 이하를 절

단하고 족근부의 피부를 관절낭이 드러나도록 수차례 절개하였다. 절단한 다리를 15ml conical tube(SPL, Korea)에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 삼출액을 검액으로 이용하였다. TNF- α 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(이하 ELISA) kit (Endogen, USA)를 이용하여 측정하였다. 표준액 및 검액은 1시간, biotinylated antibody reagent는 2시간, streptavidin-HRP solution은 30분간, TMB substrate solution을 30분간 반응시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준액의 흡광도로부터 아래의 회귀 방정식을 구한 후, 검액의 흡광도를 방정식에 적용하여 TNF- α 의 농도를 구하였다.

$$y(\text{흡광도}) = 0.0008 \times x(\text{TNF-}\alpha \text{ 농도}) + 0.1036$$

10) 족관절 삼출액 Interleukin-1 β 함량 측정

항목 9)에서 얻어진 삼출액을 검액으로 하여 IL-1 β 함량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 30분간, streptavidin-HRP solution은 30분간, TMB substrate solution을 30분간 반응시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준액의 흡광도로부터 아래의 회귀 방정식을 구한 후, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 IL-1 β 의 농도를 구하였다.

$$y(\text{흡광도}) = 0.0011 \times x(\text{IL-1}\beta \text{ 농도}) + 0.2246$$

11) c-fos immunohistochemistry

c-fos 반응을 관찰하기 위하여 microtome을 사용하여 Paxinos 및 Watson(1986)이 제작한 Rat Brain Atlas를 참조하여 bregma -5.30mm에서 -8.30mm 사이를 30 μ m 두께로 조직을 절단하였다. 부유조직은 50mM PBS로 두 번 세척하고 0.2% Triton X-100에 30분간 방치하였으며, 면역조직 화학법에 사용한 c-fos 단백질에 대한 일차 항혈청은 anti-c-fos antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1 : 1,000으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 조직에 처리하여 반응시켰다. 일차 항혈청 처리가 끝난 조직은 rabbit에서 생산한 이차항체 biotinylated anti-rabbit antibody(1 : 200)를 이용하여 실온에서 1시간 처리하

였으며, 항체반응이 끝난 조직은 Vector Elite ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Antibody-Avidin-biotin-peroxidase complex는 0.05% diaminobenzidine 에서 반응시켜 발색시키고, 발색이 끝난 조직은 0.1M PBS로 3회 washing하여 발색반응을 중지시켰다. 슬라이드에 mount한 후 ethanol로 탈수시키고 Permount (Fisher Scientific, USA)로 coverslip 하였다. 이어서 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 c-fos positive neurons 수를 관찰하였다.

12) NADPH-diaphorase 양성 신경세포의 측정

실험 종료일에 ether 마취하에 rat을 개복하여 심장채혈하고 0.05M PBS(pH 7.4)를 심장으로 관류시킨 후 혈액이 모두 제거되면 4% PFA 용액을 심장으로 관류시켜 고정하였다. 뇌를 조심스럽게 분리한 후 약 60분간 postfix하고 phosphate buffer(PB)로 몇 번 깨끗이 씻은 다음 30% sucrose에 보관하였다. 다음날 15% sucrose에 뇌를 옮겨 담고, 24시간 후 microtome 을 사용하여 Paxinos 및 Watson이 제작한 Rat Brain Atlas를 참조하여 bregma -5.30mm에서 -8.30mm 사이를 30 μ m 두께로 절단하였다. 조직을 자른 후 0.1M PBS + 0.3% Triton X-100 + 0.1mg/ml nitroblue tetrazolium + 0.1mg/ml-NADPH 용액으로 3시간가량 incubation하고, 0.1M PBS로 3회 washing 후 gelatincoated 슬라이드에 mount한 후 ethanol로 탈수시키고 Permount (Fisher Scientific, USA)로 coverslip 하였다. 이어서 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 NADPH-d positive neurons 수를 관찰하였다.

13) 통계처리

- ① 실험 결과의 자료처리는 SPSS 프로그램(ver. 12.0)을 이용하여 모든 자료의 평균(Mean)과 표준편차(SD)를 산출하였다.
- ② 구체적인 자료 분석방법에 있어서, 군간의 치료 성적 차이는 분산분석 ANOVA를 이용하였고, 사후 검정은 Tukey test를 이용하였다.
- ③ 군간의 유의성은 N군과 C군, C군과 TH군, C군 TL군, C군과 S군, TH군과 S군, TL군과 S군, TH군과 TL군 사이에만 국한하였다.
- ④ 모든 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정한다.

III. 결 과

1. 육안관찰 소견

실험 종료일에 Collagen을 접종하지 않은 N군과 Collagen을 접종하여 관절염을 유발한 C군의 족부를 비교 관찰하였다(Fig. 1). N군에 비해 C군에서 극심한 관절의 변형 및 부종이 유발되었다.

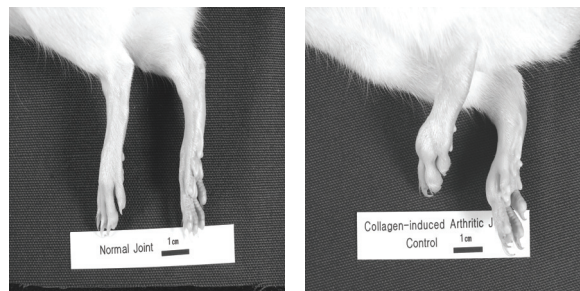


Fig. 1. Photograph of tarsal joint in experimental animals

It is about gross lesion of Normal group and Collagen-induced arthritis group. Scale bar represents 1cm.

2. 체중 변화

실험 시작일에 N군에 비해 C, TH, TL, S군은 상

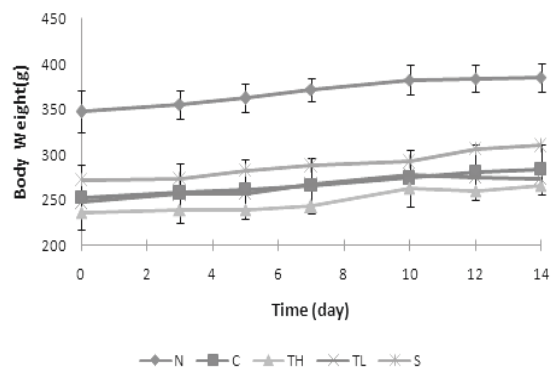


Fig. 2. The graph that body weight's change is displayed

The horizontal axis represents experimental day.
 N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean \pm SD(n=7).

대적으로 체중이 적었으나 실험 종료일까지 N, C, TH, TL, S군의 체중이 전반적으로 증가하였으며, 체중의 증가 양상에 있어 N군을 제외한 C, TH, TL, S군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

3. 족부종의 변화

실험 과정 중 N군에 비해 다른 모든 군의 족부종

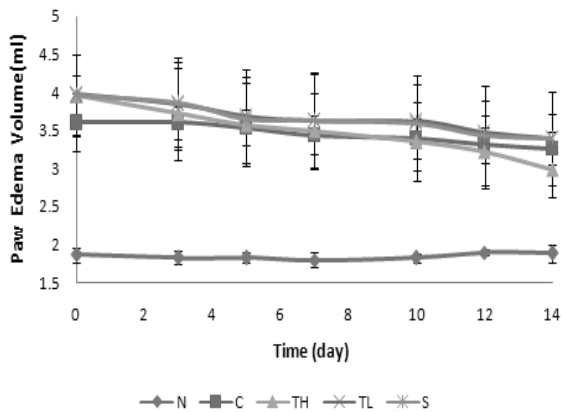


Fig. 3. The graph that paw edema volume's change is displayed

The horizontal axis represents experimental day.
 N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.

Table 1. The Improvement of Paw Edema Volume During Experimentation

Group	The change of paw edema volume(ml)
N	-0.02±0.10
C	0.34±0.34
TH	0.96±0.48*
TL	0.58±0.44
S	0.56±0.32

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group
 Values mean that 0 day minus 14th day is represented.
 Values are represented as mean±SD(n=7).
 * : represents $p < 0.05$ compared to the control group.

이 증가된 상태였고, 실험 마지막 날에는 N군을 제외한 모든 군의 족부종은 감소된 상태였다(Fig. 3). 실험 첫 날과 마지막 날의 족부종의 변화량을 군 간 비교한 결과, C군과 N군은 유의한 차이가 없었으며, TH군과 C군은 유의한 차이($p=0.024$)를 보였으나, TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성은 없었다(Table 1).

4. 족근 관절폭의 변화

실험 과정 중 N군에 비해 다른 모든 군의 족근 관

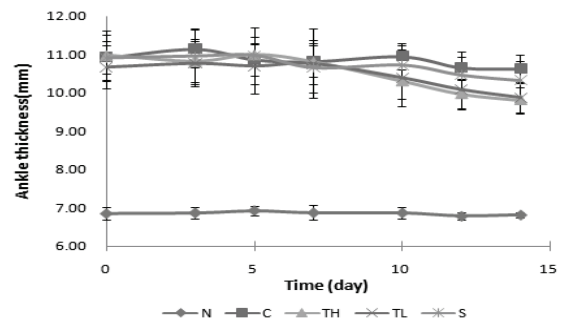


Fig. 4. The graph that ankle thickness's change is displayed

The horizontal axis represents experimental day.
 N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean±SD(n=7).

Table 2. The Improvement of Ankle Joint Thickness During Experimentation

Group	The change of ankle joint thickness(mm)
N	0.04±0.20
C	0.29±0.31
TH	1.17±0.63**
TL	0.81±0.27
S	0.58±0.40

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values mean that 0 day minus 14th day is represented.
 Values are represented as mean±SD(n=7).
 ** : represents $p < 0.01$ compared to the control group.

질폭이 증가된 상태였고, 실험 마지막 날에는 모든 군의 족근 관절폭은 감소된 상태였다(Fig. 4). 실험 첫날과 마지막 날의 족근 관절폭의 변화량을 군 간 비교한 결과, C군과 N군은 유의한 차이가 없었으며, TH군과 C군은 유의한 차이($p=0.002$)를 보였으나, TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성은 없었다(Table 2).

5. 혈청 내 WBC 변화

실험 마지막 날 혈액학적 검사를 통해 WBC를 검량한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=0.007$, $p=0.013$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, TH군과 TL군이 S군에 대해 유의한 차이($p=0.001$, $p=0.002$)를 나타내었다(Table 3).

Table 3. The WBC Count in Serum

Group	WBC count($\times 10^3/\mu\text{l}$)
N	3.39 \pm 0.25
C	5.89 \pm 0.53 ^{###}
TH	4.40 \pm 1.82 ^{**, ††}
TL	4.50 \pm 0.69 ^{*, ††}
S	6.27 \pm 0.45

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean \pm SD(n=7).
 *, ** : represents $p<0.05$, $p<0.01$ compared to the control group.
 ### : presents $p<0.001$ compared to the normal group.
 †† : presents $p<0.01$ compared to the saline group.

6. Tumor necrosis factor- α 함량 변화

실험 마지막 날 삼출물의 TNF- α 를 검량한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=0.000$, $p=0.011$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, TH군과 S군, TH군과 TL군 사이에서 유의한 차이($p=0.000$, $p=0.000$)를 나타내었다(Table 4).

Table 4. The Concentration of TNF- α in Effusion

Group	TNF- α concentration(pg/ml)
N	78.14 \pm 30.08
C	816.00 \pm 57.08 ^{###}
TH	493.86 \pm 44.99 ^{***, †††, †††}
TL	697.61 \pm 60.02 [*]
S	732.79 \pm 100.16

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean \pm SD(n=7).
 *, *** : represents $p<0.05$, $p<0.001$ compared to the control group.
 ### : represents $p<0.001$ compared to the normal group.
 ††† : represents $p<0.001$ compared to the saline group.
 ††† : represents $p<0.001$ compared to the 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture treated group.

7. Interleukin-1 β 함량 변화

실험 마지막 날 삼출물의 IL-1 β 를 검량한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=$

Table 5. The Concentration of IL-1 β in Effusion

Group	IL-1 β concentration(pg/ml)
N	70.86 \pm 24.06
C	670.34 \pm 193.96 ^{###}
TH	265.51 \pm 60.47 ^{***, †††, †}
TL	421.43 \pm 100.88 [*]
S	574.86 \pm 131.79

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean \pm SD(n=7).
 *, *** : represents $p<0.05$, $p<0.001$ compared to the control group.
 ### : represents $p<0.001$ compared to the normal group.
 ††† : represents $p<0.001$ compared to the saline group.
 † : represents $p<0.05$ compared to the 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture treated group.

0.000, $p=0.013$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, TH군과 S군, TH군과 TL군 사이에서 유의한 차이($p=0.000$, $p=0.044$)를 나타내었다(Table 5).

8. 뇌의 조직화학 변화

1) c-fos 면역화학

실험 종료일에 면역화학법을 통하여 피질영역인 S1S2의 c-fos 양성 신경세포를 관찰한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL, S군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=0.001$, $p=0.002$, $p=0.014$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, 유의한 차이는 없었다(Table 6).

Table 6. The Number of c-fos Positive Neurons in S1S2(cortex)

Group	No. of c-fos positive cells
N	103.0±15.0
C	147.9±11.1###
TH	107.2±8.5**
TL	112.0±7.8*
S	119.0±17.9*

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean±SD(n=7).
 *, ** : represents $p<0.05$, $p<0.01$ compared to the control group.
 ### : represents $p<0.001$ compared to the normal group.

2) NADPH 조직화학

(1) CPu(caudate putamen)에서 NADPH-d 양성 세포수 변화

실험 종료일에 조직화학법을 통하여 CPu영역의 NADPH-d 양성 신경세포를 관찰한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=0.005$, $p=0.005$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, 유의한 차이는 없었다(Table 7).

Table 7. The Number of NADPH-d Positive Neurons in CPu(caudate putamen)

Group	No. of NADPH-d positive cells
N	24.5±7.5
C	44.5±4.4###
TH	30.9±6.4**
TL	30.9±3.3**
S	38.6±3.0

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2 ml) injection group.
 Values are represented as mean±SD(n=7).
 ** : represents $p<0.01$ compared to the control group.
 ### : represents $p<0.001$ compared to the normal group.

(2) Tfp(transverse fibers of pons)에서 NADPH-d 양성 세포수 변화

실험 종료일에 조직화학법을 통하여 Tfp영역의 NADPH-d 양성 신경세포를 관찰한 결과, C군은 N군에 대해 유의성 있는 증가($p=0.000$)를 보였고, TH, TL, S군은 각각 C군에 대해 유의한 감소($p=0.000$, $p=0.007$)를 나타냈다. TH, TL, S군 사이의 통계적 유의성을 살펴 본 결과, TH군과 S군 사이에서 유의한 차이($p=0.014$)를 나타내었다(Table 8).

Table 8. The Number of NADPH-d Positive Neurons in Tfp(transverse fibers of pons)

Group	No. of NADPH-d positive cells
N	10.8±1.8
C	30.2±5.1###
TH	14.8±4.1***, †
TL	18.0±1.6***
S	22.2±2.3**

N : Normal group.
 C : Control group(collagen-induced arthritis group).
 TH : 10mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 TL : 5mg/kg *Trachelospermi Caulis* herbal-acupuncture (0.2ml) treated group.
 S : Saline(0.2ml) injection group.
 Values are represented as mean±SD(n=7).
 , * : represents $p<0.01$, $p<0.001$ compared to the control group.
 ### : represents $p<0.001$ compared to the normal group.
 † : represents $p<0.05$ compared to the saline group.

IV. 고찰

류마티오이드 관절염은 만성관절염 중 퇴행성 관절염 다음으로 흔히 볼 수 있는 원인불명의 만성 전신 질환으로, 주로 말초관절에 염증을 일으키고 대칭적으로 유발되며 전신증상으로 혈액, 폐, 신경 및 심혈관계 등의 이상을 일으키게 된다^{22,23}. 발병률은 2005년도 기준으로 우리나라는 약 1%로 매년 환자 수가 늘고 있으며, 45~65세에서 가장 많이 발생하고 성별로는 여성이 남성보다 3배 이상 더 많이 발생하는 것으로 밝혀져 있으며²⁴, 개인의 육체적인 문제뿐만 아니라 심리적·사회적인 요인에 큰 영향을 미치게 된다²⁵⁻²⁹.

류마티오이드 관절 증상은 손의 근위 지간관절, 중수수지관절, 주관절, 견관절, 슬관절 및 중족 족지관절 등에 초기 증상이 나타나며, 관절 내 염증은 관절 연골뿐만 아니라 인대 건막 및 건 등 관절 주위 조직의 파괴, 근육의 쇠약 및 위축으로 인한 불균형, 건의 구축 등을 일으켜 관절에 변형이나 아탈구 등이 나타나게 된다^{1,4}.

현재까지 밝혀진 류마티오이드 관절염의 병리기전을 살펴보면, 활액막의 비후와 활액막 조직이 pannus를 형성하여 관절 연골의 미란과 연골하 골의 손상을 일으키는 것으로, 초기 소견은 미세 혈관의 손상과 조직의 부종, 활막세포의 증식과 모세 혈관 정맥 주위의 T-림파구 침윤이다. 만성적으로 진행할수록 지연성 과민 반응에 관계하는 CD4+ T-세포나 CD8+ T-세포 같은 단핵 염증세포와 B-림파구, 형질세포, 비만세포, 대식세포의 침윤이 관찰된다. 활액막 조직의 변화는 T-림파구에서 분비되는 cytokine에 의해 활액막 증식과 염증반응, 골 및 연골의 파괴가 촉진된다. 이러한 cytokine에는 IL-1, 2, 6, 8과 TNF- α , GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), TGF- β (transforming growth factor- β) 등이 포함되는데, 이들에 의해 세포의 활성화와 다양한 단백분해 효소, PGE₂, oxygen radical 등을 증가시켜 관절 조직의 손상을 초래한다. 이 외에도 항체, 면역 복합체와 보체의 활성화로 인해 염증 반응이 진행된다³⁰⁻³⁵.

실험 모델로는 관절의 구성성분인 제2형 콜라겐 (type II collagen)이 피내 주입되어 관절염이 유발된다고 보고³⁶된 이후로 만성 관절염의 동물 모델로 자주 이용되고 있으며, Collagen induced arthritis(CIA)는 인간의 류마티오이드 관절염과 병리조직학적·면역

학적으로 유사한 면이 있다고 알려져 있다³⁷. CIA는 자가면역반응으로서 매개되는 심각한 다발성의 관절염의 양상을 보이는데, 류마티오이드 관절염과 같은 활액막염, 연골과 골의 미란 같은 조직학적 변성이 진행되면서 연골 복합체에 만성적이고 파괴적인 다발성 관절염을 야기한다³⁸.

현재 사용되는 류마티오이드 관절염의 서의학적 치료는 통증과 염증의 감소 및 관절 구조와 기능의 보호, systemic involvement의 예방을 목표로 시행되고 있다. 그 중 물리치료로는 안정과 부목 및 고정, 운동요법과 환자 교육을 시행하게 되고, 약물요법으로는 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs), COX II specific inhibitor, 스테로이드, Disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs), TNF- α neutralizing agent, Immunosuppressive therapy 등을 사용하게 되고, 만성적인 진행으로 관절의 구축과 변형이 심한 경우에는 수술요법을 시행하게 되나 일시적인 대증 치료에 불과하다³⁹⁻⁴¹.

한의학에서도 CIA 병리 모델에 대하여 약침 및 전침의 효과 및 통증제어 기전에 대한 연구가 시행되었다. CIA 동물 모델에서 祛風濕藥 약침 연구실험은 海桐皮, 獨活, 木瓜, 絲瓜絡, 桑枝에 대해서 실시되었으나 아직까지 絡石藤에 대한 실험은 아직 접하지 못하였다⁴²⁻⁴⁶. 絡石藤은 협죽도과(Apocynaceae)에 속한 마삭줄(*Trachelospermum asiaticum* var. *intermedium* NAKAD)과 털마삭줄(*Trachelospermum jasminoides* var. *pubescens* MAKINO)의 帶葉한 藤莖을 가을에 잎이 떨어지기 전에 채취 건조한 것으로, 性味는 微寒苦, 歸經은 心肝胃經으로 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 腰膝酸痛, 喉痺, 跌打損傷 등의 치료에 쓰이는데^{20,21}, 기존의 絡石藤의 연구에서 신 등⁴⁷은 문헌적 고찰을 통하여 痺症의 치료에 사용 가능함을 언급하였고 임 등⁴⁸은 鎮痛·鎮靜作用, 抗痙攣·抗菌作用, 白血球 遊走抑制作用이 있다고 보고한 바 있으나, 絡石藤을 이용한 실험적인 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 흰 쥐에게 CIA를 유발한 후 저농도 낙석등 약침군과 고농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군으로 분류하여 足三里(ST₃₆)에 주입한 뒤 형태계측학적 검사, 혈액학적 검사 및 삼출액 내 염증 매개인자 함량 검사, 뇌의 NADPH-d, c-fos 양성 신경세포를 측정하였다.

류마티오이드 관절염은 전신증상과 국소증상의 병행으로 인해 형태계측학적으로 관절부종과 변형, 체중감소 등이 나타날 수 있는데, 본 실험에서는 실험 중

료일에 Collagen을 주입한 그룹과 Collagen을 주입하지 않은 그룹의 족부를 비교 관찰한 결과, Collagen을 주입한 군 모두에서 족부의 발적 종창이 발견되었고 관절의 변형 또한 유발되었다(Fig. 1).

체중의 변화를 살펴 본 결과, 실험 시작일에 정상군에 비해 다른 군들의 체중이 상대적으로 적어 CIA가 미치는 전신적인 영향을 알 수 있었으나, 대조군과 약침 주입군, 식염수 주입군 간의 체중 증가 양상에서는 유의한 차이($p < 0.05$)가 없었다(Fig. 2).

족부종의 변화에서는 실험 과정 중 정상군에 비해 다른 모든 군의 족부종이 증가된 상태였고, 실험 마지막 날에는 정상군을 제외한 모든 군에서 개선된 상태를 나타내었다(Fig. 3). 실험 첫 날과 마지막 날의 족부종의 변화량을 군간 비교한 결과, 고농도 낙석등 약침군은 대조군과 유의한 차이($p < 0.05$)를 보여 CIA로 인한 족부종에 효과가 있음을 알 수 있었으나, 고농도, 저농도 약침군, 식염수 주입군을 군 간 비교한 결과, 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

족근 관절폭의 변화에서 실험 과정 중 정상군에 비해 다른 모든 군의 족근 관절폭이 증가된 상태였고, 실험 마지막 날에는 관절염 유발군 모두의 족근 관절폭은 감소된 상태로 CIA 국소증상에 대한 호전 상태를 나타내었고(Fig. 4), 실험 첫 날과 마지막 날의 족근 관절폭의 변화량을 군간 비교한 결과, 고농도 낙석등 약침군은 대조군과 유의한 차이($p < 0.01$)를 보여 증상 개선의 효과가 있음을 알 수 있었으나, 고농도·저농도 약침군, 식염수 주입군을 군 간 비교한 결과, 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 2).

이상의 형태계측학적 소견에서 살펴보면 CIA로 인한 전신적 및 국소적 증상에 있어서 모든 관절염 유발군이 실험 기간에 따라 증상의 호전을 보임을 알 수 있었으나, 고농도 낙석등 약침군은 대조군에 비해 족부종 및 족근 관절폭의 개선 속도에 유의한 차이가 나타나 CIA의 국소 증상 개선에는 보다 효과적일 것으로 사료된다.

실험 마지막 날 혈청 내 WBC를 검량한 결과, 대조군은 정상군에 대해 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 보였고, 대조군에 대한 비교에서는 고농도, 저농도 낙석등 약침군이 유의한 감소($p < 0.01$, $p < 0.05$)를 보였으나, 군 간 비교에서는 고농도, 저농도 낙석등 약침군 사이의 유의한 차이($p < 0.05$)가 없었다(Table 3).

이러한 결과로 collagen으로 유발된 관절염으로 인해 전반적인 WBC가 증가함을 알 수 있었고, 증가된 WBC 수치는 농도와 무관한 낙석등 약침 주입으로

유의하게 감소함을 알 수 있었다. 그러나 식염수 주입군은 WBC 감소에는 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다으며, 두 약침군의 상호 비교에서도 통계적 차이가 없는 것으로 밝혀졌다.

염증 반응시에 활액막의 T-세포는 TCR-dependent immune activation를 비롯한 몇 가지 경로로 항원에 감작하여 면역 반응을 일으키고, 이때 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)가 TCR-dependent immune activation 경로의 활성화에 영향을 미치게 된다. 관절 손상을 조절하는 중요한 inflammatory mediators인 TNF- α 는 chemokines, prostaglandins, proteases, growth factors, 활성화된 중성구와 B세포의 생성을 자극하게 되므로, TNF- α 의 발현 정도에 따라 T-세포의 활성화도와 대식세포에 의한 활액막의 염증의 정도 또한 추측해 볼 수 있다^{49,50}.

본 실험 마지막 날 삼출물 검사를 통해 TNF- α 를 검량한 결과, 대조군은 정상군에 대해 유의성 있는 증가($p < 0.001$)를 보였고, 대조군에 대한 비교에서 고농도 낙석등 약침군과 저농도 낙석등 약침군이 유의한 감소($p < 0.001$, $p < 0.05$)를 보였으며, 군 간 비교에서는 고농도 낙석등 약침군이 저농도 낙석등 약침군에 비해 유의한 감소($p < 0.001$)를 나타냈다(Table 4).

Interleukin-1 β (IL-1 β)는 대식세포, 단핵구, 활막세포 등의 다양한 세포에서 분비가 되어 chemokines, cytokines, inflammatory mediators의 생성에 관여한다. IL-1 β 를 포함한 inflammatory mediators에는 IL-6, TNF- α , IL-8, cyclooxygenase(COX)-2가 소속되어 염증세포의 침착, 혈관벽 확장 및 발열 등을 야기하며, 게다가 IL-1 β 는 활액세포의 성장을 증진시키고, 파골세포와 활액세포를 활성화시켜 관절의 뼈와 연골의 미란을 야기하는 metalloproteases, collagenases를 생성하게 한다^{51,52}.

실험 마지막 날 IL-1 β 를 검량한 결과, 대조군은 정상군에 대해 유의성 있는 증가($p < 0.001$)를 보였고, 대조군에 대한 비교에서 고농도 낙석등 약침군과 저농도 낙석등 약침군이 대조군에 대해 유의한 감소($p < 0.001$, $p < 0.05$)를 보였으며, 군 간 비교에서는 고농도 낙석등 약침군이 저농도 낙석등 약침군에 비해 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었다(Table 5).

삼출물 내의 TNF- α , IL-1 β 의 함량에서 대조군은 정상군에 비해 유의한 증가를 보여 cytokine에 의해 매개되는 관절내 염증이 활발하게 진행되고 있음을 알 수 있었다. 낙석등 약침액의 주입은 농도에 따라 차이가 있었지만 cytokine의 활성도를 억제하였고, 두

약침군의 상호 비교에서도 통계적 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 식염수 주입군은 TNF- α , IL-1 β 에 의해 매개되는 관절내 염증을 효과적으로 제어하지 못하는 것으로 밝혀졌다.

통증에 감각되면 주의, 각성, 학습 및 기억의 과정과 연관되어 있는 해마는 통증과 스트레스 자극의 통로 역할을 하여, 해마구성체와 대뇌피질과의 상호영향을 통해 동통을 대뇌의 여러 부위로 전달시키는 역할을 한다^{53,54}. 외부 자극으로 인한 뇌의 신경세포 활성도를 측정하기 위해서는 immediate early gene의 일종인 c-fos 발현 양성 세포를 측정하게 되는데, 뇌 조직에서 c-fos 발현은 좋은 대사 지표로 자극에 관련된 신경조직에서 신경가소성 변화에 관여하는 것으로 생각된다. c-fos는 뇌손상, 스트레스, 통증, 에탄올, 저산소증 등과 같은 자극에 의해 유도되며, 통각을 감지시 척수를 비롯한 전반적인 뇌 구조물에 c-fos 양성 반응이 증가하게 되고 이때 이질통이나 통각과민 같은 통증 양상이 나타날 가능성이 있다고 하였으며, 진통제나 NOS inhibitor의 제제 투여시 c-fos 양성 세포는 줄어든다고 하였다⁵⁵⁻⁵⁷.

실험 종료일에 피질영역인 S1S2의 c-fos 양성 신경 세포수를 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의한 증가($p < 0.001$)를 보였고, 대조군과의 비교에서 고농도 낙석등 약침군과 저농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군은 대조군에 비하여 유의한 감소($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)를 보였으나, 군 간 비교에서는 유의성($p < 0.05$)이 없는 것으로 나타났다(Table 6).

C-fos 반응을 통한 피질의 가소성을 살펴본 결과, collagen 주입 후 피질 영역의 c-fos 양성 세포가 유의하게 증가해 관절염에 의한 신경 가소성이 향상됨을 알 수 있었고, 약침군과 식염수 주입군 모두 c-fos 발현 정도를 유의하게 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었으나, 식염수 주입군과 약침군과의 효능 차이는 없었으며, 두 약침군의 상호 비교에서도 통계적 차이가 없는 것으로 밝혀졌다.

Nitric oxide(NO)는 L-arginine이 nitric oxide synthetase(NOS)다축매 동위효소들의 반응을 통해서 뿐만 아니라, NO와 L-citrulline으로 화학변화 시키는 데 필요한 다양한 보조인자들의 산화반응에 의해 합성된다. NOS는 macrophage NOS, endothelial NOS, neuronal NOS가 있으며, 생성기전에 따라 inducible NOS(iNOS) 및 constitutive NOS(cNOS)의 2가지로 나뉜다. iNOS의 일종인 macrophage NOS는 자극에 의해 효소가 활성화되는 바 평상시는 작용을 하지 않

으나 일단 자극에 의해 유도가 되면 cNOS보다 활성화 정도가 매우 높다. iNOS는 IL-1 α , β 나 TNF- α , interferon- γ 같은 cytokine에 의해 합성 촉진되고 생성된 NO는 대식세포의 비특이적 면역반응과 호중구의 세균 살상과도 관련이 있다. 항염증과 조직 보호의 작용이 있는 것으로 추측되는 cNOS와 달리 iNOS는 염증을 유발하거나 조직을 파괴하는 작용이 있는 것으로 볼 수 있는데 이 중 연골세포나 활막세포에 의해 생성된 NO의 작용이 염증성 관절염에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활막조직을 배양한 경우에도 류마티드 관절염 환자의 활막조직에서 퇴행성 관절염 환자에 비해 NO 생성량이 많은 경향을 관찰할 수 있다⁵⁸⁻⁶¹.

그러나 NO는 반감기가 4~6시간으로 매우 짧기 때문에 실험적으로 검량하는 것에는 어려움이 따른다. 따라서 주로 NOS나 부산물인 nitrate를 검정하거나 뇌나 척수의 NADPH-diaphorase(NADPH-d)조직 화학을 이용한다. NOS는 nitroblue tetrazolium(NBT)을 불수용성 nitroblue tetrazolium formazan(NBTf)으로 환원을 시키는 데에 있어서 전자공여자로 NADPH를 필요로 하게 되고, NADPH-d의 활성도는 NOS의 활성도와 염증의 진행 정도와 비례하게 된다^{62,63}.

실험 종료일에 CPu(caudate putamen)영역의 NADPH-d 양성 신경 세포수의 변화를 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의한 증가($p < 0.001$)를 보였고, 대조군과의 비교에서 고농도 낙석등 약침군과 저농도 낙석등 약침군은 유의한 감소($p < 0.01$)를 보였으며, 군 간 비교에서는 유의성($p < 0.05$)이 없는 것으로 나타났다(Table 7).

또한 Tfp(transverse fibers of pons)영역의 NADPH-d 양성 신경 세포수의 변화를 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 유의한 증가($p < 0.001$)를 보였고, 대조군과의 비교에서 고농도 낙석등 약침군과 저농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군은 유의한 감소($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$)를 보였으며, 군 간 비교에서는 고농도 낙석등 약침군이 식염수 주입군에 비해 유의하게 감소($p < 0.05$)하였다(Table 8).

NOS 관련 염증 반응의 정도를 파악하기 위해 NADPH-d의 활성도를 측정된 결과, collagen을 주입 후 염증 반응의 NOS 활성도가 유의하게 증가함을 알 수 있었고, CPu영역에서는 낙석등 약침군이 Tfp영역에서는 낙석등 약침군과 식염수 주입군이 통계적 유의성을 띄며 CIA로 인한 NOS의 활성도를 억제시켰다. 식염수 주입군과 약침군의 비교에서는 Tfp에서만

고농도 약침군만이 식염수 주입군에 대해 유의한 감소를 나타냈고, 두 약침군 간의 상호 비교에서는 CPU와 Tfp에서 모두 통계적 차이가 없었다.

이상의 결과를 살펴보면 전반적으로 絡石藤 약침이 CIA로 인한 전신적인 증상을 개선시키고, 혈액 WBC 수치 개선 및 삼출물 내 염증매개인자 조절로 관절염의 진행억제 및 증상완화의 효과가 있음을 알 수 있었으며, c-fos 발현 빈도 감소와 NOS로 인한 염증의 진행을 방지하는데 일정한 효과가 있음을 알 수 있었다.

실험 내에서 CIA에 대한 絡石藤 약침군의 효능은 평가 인자에 따라, 농도의 영향을 받기도 하였고 식염수 주입군에 대해 유의한 차이를 보이기도 하였다. 또한, 피질의 c-fos와 Tfp의 NADPH-d 발현정도에서는 식염수 주입만으로도 대조군과 유의한 차이를 보여 足三里(ST₃₆)의 자극만으로도 CIA에 대한 효과를 추측해 볼 수 있었으나, 경혈의 단일 침자극군을 설정하지 않아 足三里(ST₃₆)의 정확한 효능은 가늠할 수 없었다.

본 실험은 CIA 동물 모델을 대상으로 한 것으로, 실험에 사용된 동물 모델과 사람은 생리, 병리학적 차이가 있고, CIA 또한 류마티오이드 관절염과 병리발생이 정확히 일치하지 않아 絡石藤 약침이 사람의 류마티오이드 관절염에 효과가 있다고 단정하기는 어렵다. 그러나 향후 다양한 병리모델과 다각적인 연구를 통해 류마티오이드 관절염 치료의 한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

絡石藤 약침이 collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐에게 관절염을 유발하고 足三里(ST₃₆)에 상응하는 부위에 絡石藤 약침을 주입한 후 형태학적 관찰, 체중의 변화, 족부종의 변화, 족근 관절폭의 변화, 혈청 내 WBC 검사, 삼출물 내의 TNF- α 와 IL-1 β 검량 및 뇌 조직에서의 c-fos 면역화학과 NADPH-d 조직화학을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 족부종의 변화량에서 고농도 낙석등 약침군이 대조군과 유의한 차이가 있었다.
2. 족근 관절폭의 변화량에서 고농도 낙석등 약침

군이 대조군과 유의한 차이가 있었다.

3. 혈액의 WBC 검량에서 고농도·저농도 낙석등 약침군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.
4. 삼출액 내 TNF- α 함량은 고농도·저농도 낙석등 약침군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, 고농도 낙석등 약침군은 저농도 낙석등 약침군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.
5. 삼출액 내 IL-1 β 함량은 고농도·저농도 낙석등 약침군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, 고농도 낙석등 약침군은 저농도 낙석등 약침군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.
6. 피질영역인 SIS2의 c-fos 양성 반응은 고농도·저농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군이 대조군에 대해 유의한 감소를 나타내었다.
7. CPU(caudate putamen)영역의 NADPH-d 양성 반응은 고농도, 저농도 낙석등 약침군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.
8. Tfp(transverse fibers of pons)영역의 NADPH-d 양성 반응은 고농도, 저농도 낙석등 약침군, 식염수 주입군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었고, 고농도 낙석등 약침군은 식염수 주입군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 絡石藤 약침은 collagen 유발 관절염의 발생을 억제하고 진행을 완화시키며, c-fos와 NOS 발현 억제에 효과가 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학 6판. 서울 : 최신의 학사. 2006 : 232-47.
2. 미국정형외과학회. 근골격계 진단 및 치료의 핵심. 서울 : 한우리. 2001 : 57-8.
3. 프리미어 의학연구회. 프리미어 내과 volume 4. 서울 : 고려의학. 2008 : 2083-90.
4. 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학. 서울 : 도서출판 MIP. 2006 : 2148-56.
5. American College of Rheumatology. 2008 Recommendations for the Use of Nonbiologic and Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 2008 ;

- 59(6) : 762-84.
6. American College of Rheumatology. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 ; 46(2) : 328-46.
 7. 대한침구학회 교재편찬위원회. 鍼灸學 下. 과주 : 집문당. 2008 : 136-8.
 8. 張景岳. 景岳全書. 서울 : 한미의학. 2006 : 477-90.
 9. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 5-8.
 10. Khalifeh MS, Hananeh W, Al-Rukibat R, Okour O, Boumezrag A. Clinical and histopathological evaluation of MDP/collagen induced arthritis rat model (MCIA) after treatment with *Urtica dioica*, *plantago major* and *Hypericum perforatum* L herbal mixture. *Exp Anim.* 2008 ; 57(2) : 101-10.
 11. Haas CS, Amin MA, Ruth JH, Allen BL, Ahmed S, Pakozdi A, Woods JM, Shahrara S, Koch AE. In vivo inhibition of angiogenesis by interleukin-13 gene therapy in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 ; 56(8) : 2535-48.
 12. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 ; 56(4) : 1175-86.
 13. 최정식, 송태원, 김동희. 鷄血藤이 collagen으로誘發된 생쥐의 關節炎抑制에 關한 研究. 대한본초학회지. 2003 ; 18(3) : 79-88.
 14. 신미경, 노성수, 서영배. 동충하초 추출물의 콜라겐으로 유발된 관절염 생쥐 모델에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22(3) : 57-65.
 15. 장선일, 윤용갑. DBA1J 마우스에서 加減補中益氣湯이 콜라겐 유도 관절염 억제에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2003 ; 18(3) : 143-51.
 16. 이현진, 조현석, 황민섭, 정찬영, 이동진, 김은정, 김갑성, 김경호. 녹용약침이 백서의 제2형 Collagen 유발 관절염에서 iNOS 발현과 NO 생성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008 ; 25(2) : 105-16.
 17. 이창환, 조재용, 이승덕, 김경호, 박인식, 김갑성. 유근피 약침이 제2형 Collagen 관절염에서 MIF 활성화 억제 및 T세포 분화 조절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008 ; 25(4) : 81-94.
 18. 류성룡, 백용현, 박동석. 電鍼刺戟의 Collagen 유발 關節炎 動物모델에 대한 鎮痛效果 및 機轉에 關한 研究 -Serotonergic Mechanism을 중심으로-. 대한침구학회지. 2006 ; 23(3) : 77-90.
 19. 김은정, 백용현, 강성길. 電鍼의 collagen 誘發 關節炎에 대한 鎮痛 效果 및 그 機轉에 關한 研究 -opioidergic mechanism을 중심으로-. 대한침구학회지. 2006 ; 23(4) : 149-62.
 20. 전국한의과대학 본초학편집위원회. 本草學. 서울 : 영림사. 2005 : 319-20.
 21. 申佶求. 申氏本草學. 서울 : 수문사. 1973 : 546-7.
 22. 진국의과대학교수. 오늘의 진단 및 치료. 서울 : 한우리. 2000 : 892-907.
 23. 서울대학교 의과대학 내과학교실 편. 임상내과학 (II). 서울 : 고려의학. 2004 ; 2067-79.
 24. 이주희, 정은정, 이영호, 지종대, 안홍석. 류마티스 관절염 환자의 항산화 영양소 섭취상태와 생활습관. 대한지역사회영양학회지. 2008 ; 13(2) : 253-62.
 25. 한정원, 박인혜. 류마티스 관절염 환자의 무기력과 건강행위에 관한 연구. 근관절건강학회지. 2008 ; 15(1) : 33-40.
 26. 장세영, 박상연. 류마티스 관절염 환자의 원인지각, 대응양상, 사회심리적 적응과의 관계. 근관절건강학회지. 2002 ; 9(2) : 187-202.
 27. 박정숙, 조혜명. 류마티스 관절염환자의 피로에 대한 조사. 한국간호교육학회지. 2001 ; 7(2) : 245-53.
 28. 유경희, 김금순. 류마티스 관절염 환자가 지각하는 통증과 우울 정도 및 관련 요인. 대한기본간호학회지. 2001 ; 8(2) : 189-98.
 29. 최경숙, 은영, 함미영. 류마티스 관절염 환자 배우자의 부담감. 근관절건강학회지. 2000 ; 7(2) : 241-57.
 30. Sambrook P, Schrier L, Taylor T, Ellis A. *The Musculoskeletal System.* Churchill Livingstone. 2001 : 1-20.
 31. 김성윤. 류마티스 관절염의 면역병인. 대한내과학회지. 1987 ; 33(5) : 577-80.
 32. Bunim JJ, Sokoloff L, Williams RR, Black RL. Rheumatoid arthritis: A review of recent advances in our knowledge concerning pathology, diagnosis, and treatment. *J Chronic Dis.* 1955 ;

- 1(2) : 168-210.
33. Glynn LE. Pathology, pathogenesis, and aetiology of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1972 ; 31(5) : 412-20.
 34. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008 ; 118(11) : 3537-45.
 35. Andersson AK, Li C, Brennan FM. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008 ; 10(2) : 204.
 36. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen : An experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 1977 ; 146 : 857-68.
 37. 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.
 38. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* 1997 ; 61(19) : 1861-78.
 39. 김형섭. 내과학 5. 서울 : 고려의학 2003 : 279-94.
 40. 신규성. 파워내과학 4. 서울 : 군자출판사. 2004. 286-97.
 41. British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology. Guideline for the Management of Rheumatoid Arthritis (the first two years). *Rheumatology.* 2006 ; 45(9) : 1167-69.
 42. 채충현, 최선미, 임운경. 足三里 絲瓜絡藥鍼이 생쥐의 Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2005 ; 22(1) : 131-44.
 43. 김영화, 이현. 海桐皮藥鍼이 Collagen-induced Arthritis 억제 및 면역조절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007 ; 24(5) : 171-83.
 44. 양기영, 김영일, 이현. 足三里 獨活藥鍼의 Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006 ; 23(2) : 191-206.
 45. 정영돈, 임운경, 이현. 足三里 桑枝藥鍼이 Collagen-induced arthritis에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006 ; 23(6) : 29-44.
 46. 신동수, 김영일, 이현. 木瓜 藥鍼이 Collagen-induced Arthritis 억제 및 면역조절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007 ; 24(3) : 127-43.
 47. 신민교, 송호준, 이장천. 絡石藤과 地錦의 效能에 관한 書誌學的 比較考察. 대한본초학회지. 1988 ; 13(1) : 37-43.
 48. 임형호, 김성수, 신현대. 絡石藤의 效能에 관한 實驗的 研究. 경희의학, 1991 ; 7(3) : 334-41.
 49. Klareskog L, McDevitt H. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF- α and the possible absence of specific immune reactions. *Curr Opin Immunol.* 1999 ; 11(6) : 657-62.
 50. Segal B, Rhodus NL, Patel K. Tumor necrosis factor(TNF) inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2008 ; 106(6) : 778-87.
 51. Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 ; 13(4-5) : 341-55.
 52. Hosaka K, Ryu J, Saitoh S, Ishii T, Kuroda K, Shimizu K. The combined effects of anti-TNF α antibody and IL-1 receptor antagonist in human rheumatoid arthritis synovial membrane. *Cytokines.* 2005 ; 32(6) : 263-9.
 53. Aloisi AM, Ceccarelli I, Herdegen T. Gonadectomy and persistent pain differently affect hippocampal c-Fos expression in male and female rats. *Neurosci Lett.* 2000 ; 281(1) : 29-32.
 54. Harris JA. Using c-fos as a Neural Marker of Pain. *Brain Res Bull.* 1998 ; 45(1) : 1-8.
 55. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Aloisi AM. Effects of Formalin Pain on Hippocampal c-Fos Expression in Male and Female Rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999 ; 64(4) : 797-802.
 56. Quintero L, Cuesta MC, Silva JA, Arcaya JL, Pinerua-Suhaibar L, Maixner W, Suarez-Roca H. Repeated swim stress increases pain-induced expression of c-Fos in the rat lumbar cord. *Brain Res.* 2003 ; 965(1-2) : 259-68.
 57. 조성범, 채한정, 강장숙, 김형룡. Lidocaine에 의한 경련이 뇌조직에서 c-fos 발현에 미치는 영향. 원광생체재료매식연구소. 1998 ; 7(1) : 89-90.
 58. 박동권, 김상철. 백서의 실험적 치아이동시 Nitric Oxide Synthetase의 발현 양상. 대한치과교정학

- 회지. 2001 ; 31(1) : 107-20.
59. 권용화, 주경빈, 배상철, 김성윤. 염증성 관절염에서 Nitric Oxide(NO)의 역할에 관한 연구. 한양의 대학술지. 1996 ; 16(2) : 227-36.
60. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis.* 1992 ; 51 : 1219-22.
61. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie Q, Nathan CF, Wahl SM. Supression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1996 ; 178 : 749-54.
62. Xu L, Matsumura S, Mabuchi T, Takagi K, Abe T, Ito S. In situ measurement of neuronal nitric oxide synthase activity in the spinal cord by NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods.* 2006 ; 150(2) : 174-84.
63. Solodkin A, Traub RJ, Gebhart GF. Unilateral hindpaw inflammation produces a bilateral increase in NADPH-diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neurosci.* 1992 ; 51 : 495-9.