

원저

농도별 봉독약침이 생쥐의 Type II Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

이승우 · 김유종 · 김은정 · 이승덕 · 김갑성 · 윤종화

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Varying Concentrations of Bee Venom Pharmacopuncture Treatments on Type II Collagen Induced Arthritis in Mice

Lee Sung-woo, Kim Yu-jong, Kim Eun-jung, Lee Seung-deok,
Kim Kap-sung and Yoon Jong-hwa

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Dongguk University

Objectives : The purpose of this study is to inquire into the effect of different concentrations of bee venom pharmacopuncture to inhibit genesis of pro-inflammatory cytokines and to inhibit nuclear factor (NF)- κ B activation on type II collagen induced arthritis.

Methods : The experiment was divided into category of the normal group (NOR)-no treated group, control group (CON)-CIA (collagen induced arthritis) induced group, and 4,000:1 bee venom group (BV-L)-4000:1 bee venom pharmacopuncture treated group after CIA, and 2000:1 bee venom group (BV-H)-2,000:1 Bee venom pharmacopuncture treated group after CIA. RA was induced in the mice via injecting 50 μ l CII mixed CFA. The bee venom pharmacopuncture was applied on ST₃₅ for 19 days from the 3rd day of RA inducement. To research the effect on the expression of IKK (I κ B kinase), iNOS (inducible nitric oxide synthase) & COX-2 (cyclooxygenase-2) mRNA, RT-PCR was performed on synovial membrane cells from the knee joint of CIA mice.

Results : The PMA-induced I κ B kinase (IKK), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression were dose-dependantly decreased in bee venom treated with synoviocytes. In mice treated with bee venom pharmacopuncture, foot thickness and the damage of synovial membranes of the joint was lessened, and the activation of RA-related pro-inflammatory cytokines such as MIF, TNF- α

- 접수 : 2012. 2. 6. · 수정 : 2012. 2. 9. · 채택 : 2012. 2. 10.
· 교신저자 : 윤종화, 경주시 용강동 357번지 동국대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 054-770-2387 E-mail : item0916@chol.com

and MMP-9 was significantly decreased. The activation of iNOS and COX-2 was suppressed by the inhibition of NF- κ B. In addition, each data was shown that 2,000:1 bee venom pharmacopuncture was more effective than 4,000:1 bee venom pharmacopuncture.

Conclusions : It is speculated that bee venom pharmacopuncture has the therapeutic effect of palliating the damage of the synovial membrane and inflammation on RA by suppressing of NF- κ B activation.

Key words : bee venom, concentration, collagen induced arthritis

I. 서론

류머티스성 관절염은 대표적인 자가면역성 질환이며 관절을 둘러싸고 있는 활막 조직의 만성 염증성 질환으로, 연골과 골괴괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 초래한다. 이는 다양한 진신증상으로 나타나기도 하나, 대칭적으로 말초관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염이 특징적이다¹⁾.

한의학에서 류머티스성 관절염은 痺證, 歷節風, 白虎風, 鶴膝風, 痛風 등의 범주에 속한다고 볼 수 있으며, 치료로 병의 초·중기에는 淸熱利濕, 行氣活血 등의 瀉法을 위주로 하고 만성기에는 補肝腎, 益氣活血 등과 疏風通絡, 化痰祛瘀 등의 扶正祛邪의 治法을 동시에 운용하고 있다²⁾. 류머티스성 관절염의 치료는 장기간의 지속적인 치료를 요하는 만성 질환이라는 점에서, 보다 안전하고 효과적인 치료방법이 필요할 것으로 생각되며, 현재 임상에서 관절염 치료에 활용되는 봉독약침이 그 대안으로 기대된다.

蜂毒藥鍼은 經絡學說의 원리에 의하여 蜂毒을 추출, 가공한 후 질병과 관련한 穴에 주입함으로써 刺鍼效果 및 蜂毒의 생화학적 효과를 동시에 이용하는 것으로, 최근의 연구에서 진통, 소염, 해열, 활혈, 항경련, 면역증강, 항암효과 등이 있는 것으로 알려져 있다³⁾. 관절염에 대한 봉독약침의 최근의 연구로는 김등⁴⁾이 제2형 콜라겐유도 관절염 모델에서 봉독의 효과에 대해 혈청분석으로 TNF- α 와 IL-1 β 억제능이 있다는 것을 보고하였으며, 이 등⁵⁾은 봉독약침이 류머티스성 관절염 환자의 관절통증, 종창 및 급성염증 반응에 효과가 있다는 것을 보고하였다.

이에 저자는 관절염 유발 후의 항염증 효과 및 염증 전단계 물질들의 변화에 있어서 각각의 농도별 치료가 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 *in*

*vitro*에서 Type II collagen 관절염 유발 암컷 DBA 생쥐에서 무릎 윤활관절세포를 적출 및 배양하여 윤활관절세포 내의 NF- κ B 활성화 관련 cytokine인 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현양상을 조사하고, *in vivo*에서 동일 관절염 유발 생쥐를 대상으로 하여 인체의 犢鼻穴(ST₃₅)에 상응하는 부위에 두 가지 농도의 봉독약침을 각각 시술한 후, 발 두께의 비교 및 윤활관절막 내의 조직화학염색을 통한 섬유화의 변화를 관찰하고, 면역조직화학적 염색을 통해서 윤활관절막 내 RA 초기 유발 관련 cytokine인 MIF, TNF- α , MMP-9의 분포변화 및 윤활관절막내 염증반응과 관련하여 NF- κ B, iNOS, COX-2의 분포변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

태령 4주된 암컷 DBA 생쥐(오리엔트, 한국)를 분양받아 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 재료

약침기는 10 μ l Hamilton 주사기(Sigma, USA)를 사용하였다.

봉독은 GMP시설을 갖춘 대한약침학회에서 제조하여, 4,000:1 봉독약침액(BV-L)과 2,000:1 봉독약침액(BV-H)의 두 가지 종류의 봉독약침액을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 세포주는 생쥐 무릎의 윤활관절세포주를 적출하여 사용하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 윤활관절주머니를 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, USA)에 2시간 동안 반응하여 윤활관절막을 분리하고 세절하였다. 0.1% collagenase에 37°C에서 1시간 동안 처리 한 다음 3,000rpm에 5분간 원심분리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Sigma, USA)이 함유된 DMEM을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위하여 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco/ BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 flask의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/ BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3~5회 계대배양 세포를 사용하였다.

2) 윤활관절세포 내 NF-κB 활성 관련 cytokine 유전자 발현 변화조사

NF-κB 활성화에 관여하는 IκB kinase (IKK), 염증효소인 induce nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase (COX)-2의 mRNA 발현 양상을 조사하기 위하여 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 5×10⁵ cells/well의 윤활관절세포를 6 well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA) 1 ng/ml를 1시간 동안 처리하여 NF-κB 활성을 유도하였다. 2,000:1 봉독약침액(BV-H)을 희석하여 10⁻⁴, 10⁻³,

10⁻², 10⁻¹ 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 수거하여 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer(Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK, iNOS, COX-2 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

3) Collagen Induced Arthritis (CIA) 생쥐에서 NF-κB 활성 억제에 의한 항염증 효과조사

(1) 항원제조와 CIA 유발

CIA 유발을 위하여 우선 native bovine type II collagen (CII, Chondrex, USA)을 10mM acetic acid에 4mg/ml의 농도로 녹인 후 4°C에서 12시간 동안 교반하였다. CII와 4mg/ml의 complete Freund's adjuvant containing mycobacterium tuberculosis strain H37RA (CFA, Chondrex, USA)를 동량으로 섞은 후 균질기를 이용하여 1,000rpm의 속도로 혼합하였다. CIA의 유발을 위한 1차 접종은 CII와 CFA 혼합액 50µl를 꼬리연결 근육부위에 피내주사를 통해 이루어졌으며, 1차 접종 2주 후에 CII와 CFA 혼합액 25µl를 오른쪽 발바닥에 피하주사로 추가 접종하여 CIA를 유발하였다. CIA 유발 후 1주일 간격으로 발의 두께 변화를 dial thickness cage(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

Table 1. The Primer of IKK, COX-2, iNOS and β-Actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product(bp)	No. of cycles
IKK	Sense	5' CCA CCC AGT TCC ACA AGT CT 3'	380	35
	Antisense	5' CCT CCA CTG CGA ATA GCT TC 3'		
iNOS	Sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	Antisense	5'-AGAACTGAGGGTACATGCTGGAGCC-3'		
COX-2	Sense	5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	35
	Antisense	5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'		
β-actin	Sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	Antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

IKK : IκB kinase. iNOS : inducible nitric oxide synthase. COX-2 : cyclooxygenase-2.

(2) 실험군 분류 및 봉독약침의 시술

아무런 처치를 하지 않은 정상군(NOR군), CIA 유발군(CON군), CIA 유발 후 4,000:1 봉독약침군(BV-L군), CIA 유발 후 2,000:1 봉독약침군(BV-H군)으로 나누었으며, 각 군에 10마리씩 배정하였다.

CIA 유발 제3일부터 제21일까지, 매일 CIA 유발시킨 쪽의 인체의 犢鼻穴(ST₃₅)에 상응하는 부위에 10 μ l Hamilton 주사기로 BV-L과 BV-H를 10 μ l/kg의 용량으로 약침 시술하였다.

(3) 윤활관절 표본제작

CIA 유발 제 21일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% neutral buffered formalin(NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 decalcification solution (BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 제조된 연속절편은 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(4) 윤활관절 조직화학과 면역조직화학

① 윤활관절막 내 섬유화 관찰

윤활관절막 내 Collagen섬유의 분포 변화관찰은 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 통해 이루어졌다. 우선 무릎관절 표본은 Weigert's iron hematoxylin에서 20분 동안 핵 염색한 다음 Van Gieson's 염색용액에서 5분간 Collagen섬유에 대한 염색을 실시하였다.

② 윤활관절막 내 RA 초기 유발 관련 cytokine의 변화관찰

초기 RA 유도 cytokine인 macrophage migration inhibitory factor (MIF)와 pro-inflammatory cytokine인 Tumor necrosis factor (TNF)- α 그리고 단백질분해 효소인 matrix metalloproteinase (MMP)-9의 윤활관절막 내 분포변화를 조사하기 위하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum (1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse MIF (1:200, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti mouse TNF- α (1:200, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 mouse anti mouse MMP-9 (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse

IgG (Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

③ 윤활관절막 내 염증반응 변화관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor (NF)- κ B의 분포 변화를 조사하기 위하여 nuclear factor (NF)- κ B p65 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 또한 염증 효소인 iNOS와 COX-2의 조직 내 분포를 조사하기 위하여 mouse anti-mouse iNOS (1:200, Santa Cruz Biotech, USA)와 rabbit anti-mouse COX-2(1:50, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

4) 영상분석과 통계처리

mRNA 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위하여 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 본 실험 결과의 유의성 검증을 위하여 ANOVA test (SPSS14KO, SPSS, USA)를 실시하였다.

III. 결 과

1. 윤활관절세포의 염증활성 mRNA 발현억제

1) IKK mRNA 발현억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 IKK mRNA 발현은 증가하였는데, 봉독약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극 시 발현되는 IKK mRNA 발현량에 비하여 10^{-4} 에서 35%, 10^{-3} 에서 36%, 10^{-2} 에서 45.5% 및 10^{-1} 에서 59.3%가 각각 감소하였다(Fig. 1).

2) iNOS mRNA 발현억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 봉독약침액 처리 후 농도 의존

Table 2. Inhibition of Foot Thickness in Type II Collagen Induced Arthritis (CIA) evoked Mice by Bee Venom (BV) Acupuncture. (mm)

Experimental Days	Group			
	NOR	CON	BV-L	BV-H
1th day	1.84±0.03	1.83±0.06	1.89±0.06	1.85±0.08'''
7th day	1.85±0.06	4.32±0.05	3.89±0.10*	2.77±0.06*#
14th day	1.84±0.06	3.57±0.05	2.95±0.08*	2.28±0.08*#
21th day	1.83±0.03	3.18±0.11	2.53±0.05*	2.02±0.06*#

M ± S.D : mean ± standard deviation. * : $p < 0.05$ compared with CON. # : $p < 0.05$ compared with BV-L

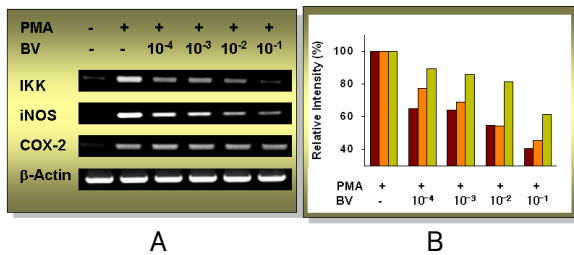


Fig. 1. Inhibitory effects of NF-κB activation-intricate cytokines by bee venom (BV) solution in vitro

A : inhibition of IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression.
 B : relative intensity for IKK (■), iNOS (■) and COX-2 (■) mRNA expression.
 PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate.
 IKK : IκB kinase. iNOS : inducible nitric oxide synthase.
 COX-2 : cyclooxygenase-2

적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 10⁻⁴에서 22.8%, 10⁻³에서 30.9%, 10⁻²에서 45.9% 및 10⁻¹에서 54.6%가 각각 감소하였다(Fig. 1).

3) COX-2 mRNA 발현억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 COX-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 봉독약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉 PMA 자극 시 발현되는 COX-2 mRNA 발현량에 비하여 10⁻⁴에서 10.8%, 10⁻³에서 14.4%, 10⁻²에서 18.8% 및 10⁻¹에서 38.7%가 각각 감소하였다(Fig. 1).

2. CIA 생쥐의 발 두께 변화와 윤활관절막 손상 완화 효과

1) 발 두께 변화

정상군에 비하여 대조군은 제7일부터 제14일 및 제21일(4.32±0.05, 3.57±0.05 및 3.18±0.11mm)까지 증

가하였으며, 실험군의 BV-L군이 제7일, 제14일 및 21일(3.89±0.10, 2.95±0.08 및 2.53±0.05mm)과 BV-H군이 제7일, 제14일 및 제21일(2.77±0.06, 2.28±0.08 및 2.02±0.06mm)에서 대조군에 비하여 각각 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다. 실험군 간의 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다(Table 2, Fig. 2A).

2) 일반적인 형태변화

CIA 유발 후 윤활관절막의 자유면(apical surface)에서 윤활세포 과형성으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가, 윤활강 쪽으로 많은 세포질돌기(filopodia), 자유면 쪽으로 침윤하는 림프구의 증가, 그리고 모세혈관 분포 증가가 관찰되었다. 봉독약침군인 BV-L군과 BV-H군에서 대조군에 비하여 윤활관절막의 자유면 두께 감소, 침윤 림프구 감소, 모세혈관 분포 감소 등이 관찰되었다. 또한 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소하여 대조군에서 관찰되는 윤활관절막과 같은 매끄러운 표면상태로 관찰되었다. 특히 실험군 간의 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 정상군과 유사한 형태로 관찰되었다(Fig. 2B).

3) 윤활관절막 내 섬유화 감소

CIA 유발 후 섬유화와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적 증가가 관찰되었다. 이런 섬유화는 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 일어났으며, 세포 가장자리가 잘 발달된 섬유모세포 침적 증가가 확인되었다. 그러나 봉독약침군인 BV-L군과 BV-H군에서 낮은 섬유화가 관찰되었다. Collagen섬유는 윤활관절막 자유면 기저부에서만 분포하였으며, 지방층 사이의 모세혈관 주변부에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었다. 또한 섬유화 주

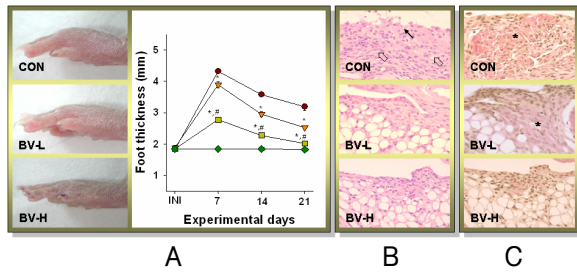


Fig. 2. Inhibitory effect of CIA on foot and knee joint by BV acupuncture *in vivo*

A : inhibition of foot thickness ($\times 4$ photo & graph).
 B : inhibition of CIA damaged synovial membrane (arrow, filopodia of synoviocyte; vacant arrow, capillary; H&E, $\times 40$).
 C : inhibition of fibrosis (asterisk(*), fibrosis area; Van Gieson's picric acid-fuchsin, $\times 40$).
 * : $p < 0.05$ compared with CON.
 # : $p < 0.05$ compared with BV-L.
 NOR (◆) : normal group.
 CON (●) : control group - none treated CIA mice.
 BV-L (▼) : 4,000:1 bee venom treated CIA mice.
 BV-H (■) : 2,000:1 bee venom treated CIA mice.

변에 침적하는 섬유모세포의 수도 적었다. 특히 이런 섬유화 양상은 실험군 간의 비교에서 BV-L군에 비하여 BV-H군에서 잘 나타났다(Fig. 2C).

4) 율관절막 내 CIA 유발 관련 cytokine 생성억제

(1) MIF 생성억제

MIF 양성반응세포의 분포는 정상군 454 ± 09 particle에 비하여 대조군은 7234 ± 78 particle로 증가하였으며, 봉독약침의 BV-L군이 5969 ± 47 particle, BV-H군이 3902 ± 69 particle로 대조군에 비하여 각각 유의성 ($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군간 비교에서는 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성 ($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 MIF 양성반응세포는 율

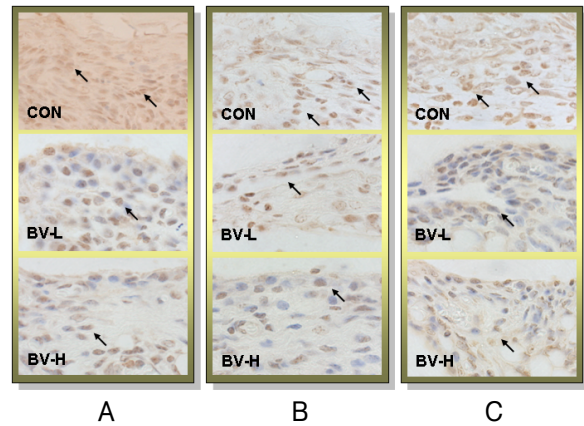


Fig. 3. Inhibition of arthritis intricate cytokines production by BV acupuncture

A : inhibition of MIF (arrow) production (MIF immunohistochemistry, $\times 1,000$).
 B : inhibition of TNF- α (arrow) production (TNF- α immunohistochemistry, $\times 1,000$).
 C : inhibition of MMP-9 (arrow) production (MMP-9 immunohistochemistry, $\times 1,000$).
 MIF : macrophage migration inhibitory factor.
 TNF- α : tumor necrosis factor- α .
 MMP-9 : matrix metalloproteinase-9.
 NOR : normal group.
 CON : control group - none treated CIA mice.
 BV-L : 4,000:1 bee venom treated CIA mice.
 BV-H : 2,000:1 bee venom treated CIA mice.

활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 1493% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 17% 및 46% 각각 감소하였다. 또한 실험군간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 MIF 양성반응이 35% 감소하였다 (Table 3, Fig. 3A).

(2) TNF- α 생성억제

TNF- α 양성반응세포의 분포는 정상군 379 ± 09 particles에 비하여 대조군은 2033 ± 35 particles로 증가하였

Table 3. The Image Analysis for Inhibition of Arthritis intricate Cytokines Production by BV Acupuncture (particles)

Objective	Group			
	NOR	CON	BV-L	BV-H
MIF	454 \pm 09	7234 \pm 78	5969 \pm 47*	3902 \pm 69*#
TNF- α	379 \pm 09	2033 \pm 35	1576 \pm 39*	726 \pm 08*#
MMP-9	311 \pm 05	2446 \pm 46	1282 \pm 21*	963 \pm 10*#

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-130)

M \pm SD : mean \pm standard deviation. * : $p < 0.05$ compared with CON. # : $p < 0.05$ compared with BV-L.

으며, 봉독약침의 BV-L군이 1576±39particles, BV-H군이 726±08particles로 대조군에 비하여 각각 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군간 비교에서는 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 TNF- α 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF- α 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 436% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 22% 및 64% 각각 감소하였다. 또한 실험군 간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 TNF- α 양성반응이 54% 감소하였다(Table 3, Fig. 3B).

(3) MMP-9 생성억제

MMP-9 양성반응세포의 분포는 정상군 311±05 particles에 비하여 대조군은 2446±46particles로 증가하였으며, 봉독약침의 BV-L군이 1282±21particles, BV-H군이 963±10particles로 대조군에 비하여 각각 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군 간 비교에서는 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 MMP-9 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MMP-9 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 686% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 48% 및 61% 각각 감소하였다. 또한 실험군 간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 MMP-9 양성반응이 25% 감소하였다(Table 3, Fig. 3C).

5) 윤활관절막 내 NF-kB 활성억제와 항염증 효과

(1) NF-kB 활성억제

NF-kB p65의 양성반응세포의 분포는 정상군 246±

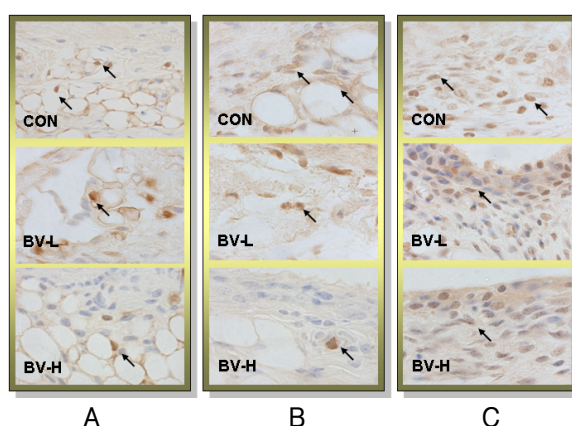


Fig. 4. Inhibition of NF-kB activation by BV acupuncture

- A. inhibition of NF-kB p65 (arrow, NF-kB p65 immunohistochemistry, $\times 1000$).
- B. inhibition of iNOS (arrow) production (iNOS immunohistochemistry, $\times 1000$).
- C. inhibition of COX-2 (arrow) production (COX-2 immunohistochemistry, $\times 1000$).

05particles에 비하여 대조군은 1959±43particles로 증가하였으며, 봉독약침의 BV-L군이 1840±53particles, BV-H군이 536±10particles로 대조군에 비하여 각각 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 NF-kB p65 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵과 핵 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-kB p65 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 696% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 각각 6% 및 73% 감소하였다. 또한 실험군 간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 NF-kB p65 양성반응이 71% 감소하였다(Table 4, Fig. 4A).

(2) 염증효소 생성 억제

iNOS의 양성 반응세포의 분포는 정상군 308±10

Table 4. The Image Analysis for Inhibition of NF-kB Activation by BV Acupuncture(particles)

Objective	Group			
	NOR	CON	BV-L	BV-H
NF-kB p65	246±05	1959±43	1840±53*	536±10*#
iNOS	308±10	2757±51	1969±35*	881±11*#
COX-2	215±07	4528±43	1144±48*	533±6*#

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-130)

M ± SD : mean ± standard deviation. * : $p < 0.05$ compared with CON. # : $p < 0.05$ compared with BV-L.

particles에 비하여 대조군은 2757 ± 51 particles로 증가하였으며, 봉독약침의 BV-L군이 1969 ± 35 particles, BV-H군이 881 ± 11 particles로 대조군에 비하여 각각 유의성($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군간 비교에서는 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 iNOS 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 795% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 29% 및 68% 각각 감소하였다. 또한 실험군간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 iNOS 양성반응이 58% 감소하였다(Table 4, Fig. 4B).

한편 COX-2의 양성반응세포의 분포는 정상군 215 ± 07 particles에 비하여 대조군은 4528 ± 43 particles로 증가하였으며, 봉독약침의 BV-L군이 1144 ± 48 particles, BV-H군이 533 ± 06 particles로 대조군에 비하여 각각 유의성($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 실험군간 비교에서는 BV-H군이 BV-L군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 억제를 나타내었다. 이런 COX-2 양성반응세포는 윤활관절막 자유면 부위에 분포하였고, 핵 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비하여 2,006% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 비하여 75% 및 88% 각각 감소하였다. 또한 실험군간 비교에서 BV-H군이 BV-L군에 비하여 COX-2 양성반응이 53% 감소하였다(Table 4, Fig. 4C).

IV. 고찰

류머티스성 관절염은 활액막의 비후와 림프구의 국소적 침윤을 병리학적 특징으로 하는 지속적인 다발성 대칭성 활액막염으로, 서서히 진행되어 활액막의 섬유화와 관절 내 연골, 연골하골 및 관절주위 연체조직이 파괴되어 결국 관절의 변형을 가져오는 전신성 자가면역질환이다⁶⁾. 류머티스성 관절염은 주로 30~40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병률을 보이지만 보통 평균 유병률은 0.8%로 추정되며⁷⁾, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀 차가 감소하는 것으로 알려져 있다.

류머티스성 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 있다. 류머티스성 관절염 발병 시 관절강 내 구성물질의 변화는 윤활액내의 Type II collagen 역가 증가⁸⁾, macrophage migration inhibitory factor (MIF)의 증가⁹⁾, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 증가¹⁰⁾, 염증성 전사인자인 nuclear factor- κ B의 활성화와 염증효소 cyclooxygenase (COX)-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가¹¹⁾, 단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)의 증가¹²⁾ 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것으로 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

류머티스성 관절염은 발병 원인을 모르기 때문에 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 현재로서는 aspirin, 비steroid성 소염제, 단순 소염제, 부신피질호르몬, 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug; 항류머티스제제), 항TNF- α 제제, 면역억제제, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다¹³⁾. 현재는 처음부터 항류마티스제제(DMARDs)를 적극적으로 사용하는 강력한 조기치료 및 다양한 복합화학요법이 추천되고 있다. 그러나 각각은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 제약이 따르는 경우가 많으며, 비steroid성 항염증 약물(NSAIDs)은 일시적으로 염증을 억제시키고 증상의 호전을 가져올 수는 있지만, 장기간 계속되는 질환의 산물들을 효과적으로 개선시키지 못할 뿐 아니라, 장기복용시 위장관의 궤양 유발, 우울증, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 부작용을 야기하는 것으로 보고되어 있어¹⁴⁾, 보다 안전하고 효과적인 치료방법이 필요할 것으로 생각되며, 현재 임상에서 관절염 치료에 활용되는 봉독약침이 그 대안으로 기대된다.

류머티스성 관절염은 痺症 혹은 歷節風의 개념으로 다루어지고 있는데, 《黃帝內經·靈樞》¹⁵⁾에서 서술한 痺症 중 여러 관절들이 손상되고 상하좌우로 이동하며 교체 발작하는 임상 증상과 성질에 근거하여 周痺 및 衆痺에 속하고, 病程이 길고 關節腫痛이 오래도록 낫지 않는다는 점에서 頑痺에 속하며, 全身大關節이 腫痛하고 晝輕夜重하며 그 통증이 극심하다는

집에서 歷節風, 白虎歷節風, 痛風 등과 유사하다. 한의학에서는 류머티스성 관절염이 先天稟賦不足, 正氣虧虛하여 風寒濕熱의 邪氣가 침범하여, 肌肉, 關節, 經絡의 사이에 阻滯되어 기혈운행이 不暢함으로 인하여 생성된 邪毒이 관절에 蘊蓄되어 발생하는 것으로 보고 있다¹⁶⁾. 치료로는 祛風除濕, 活血化癥, 通經活絡하는 약물을 다용하며, 병의 초·중기에는 清熱利濕, 行氣活血 등의 瀉法을 위주로 하고 만성기에는 補肝腎, 益氣活血 등과 疏風通絡, 化癥祛瘀 등의 扶正祛邪의 治法을 동시에 운용하여야 한다²⁾.

역절풍의 침구치료로는 經絡學的으로 足厥陰과 足少陽經을 위주로 치료할 수 있음을 제시하고 있으며¹⁷⁾, 최 등²⁾은 역대 문헌에서 취급된 슬관절 질환의 침구 치료에 대한 문헌적 연구에서 경락별로는 足少陽膽經과 足陽明胃經이 27.32%와 14.3%로 가장 많은 분포를 보였으며, 개별 경혈의 운용에서는 犢鼻(ST₃₅)와 內膝眼(EX-LE₂₀₁)이 14회의 취급혈로서 비교적 다빈도 사용 경혈로 제시하고 있다. 犢鼻(ST₃₅)는 胃經의 穴로서 通經活絡, 消風散寒, 消腫止痛하여 脚氣, 膝痛, 屈伸不利, 痛風, 難跪起 등의 병증에서 슬관절 부위의 통증조절과 기능향상의 목적으로 다용되는 穴이다¹⁸⁾. 이에 본 연구에서는 다빈도 경혈인 犢鼻(ST₃₅)를 봉독약침을 처치하는 경혈로 채택하였다.

蜂毒藥鍼은 經絡學說의 원리에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 蜂毒을 추출 가공한 후 직접 질병과 관련한 經穴, 壓痛點 혹은 체표의 축진으로 얻어진 陽性 反應點에 주입함으로써 刺鍼效果 및 蜂毒의 생화학적 효과를 동시에 이용하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하고 방어하는 藥鍼療法의 일종이다. 봉독의 주요 성분은 약 40여 가지이며 대표적인 melitin, apamin, phospholipase 등의 생화학적인 약성작용으로 강력한 항염증 작용이 있어서 관절주변의 염증세포를 제거하며, 면역체계에 영향을 주어 면역기능을 조절하는 작용을 하고, 신경계의 흥분작용을 통하여 신경장애를 개선하며, 혈관의 수축과 확장작용으로 혈액순환을 개선하고, 뇌하수체와 부신피질계를 자극하여 cortison 등의 홀몬 분비를 촉진하며 자율신경조절이 촉진되어 상승된 혈압을 내려주는 작용을 하며, prostaglandin의 생합성을 억제하여 동통을 억제하는 소염진통 효과를 발휘한다¹⁹⁾. 이 외에도 해열, 활혈, 항경련, 면역증강, 항암효과 등이 있는 것으로 알려져 있다³⁾.

관절염에 대한 봉독약침의 연구로는 김 등⁴⁾이 제2형 콜라겐유도 관절염에서 봉독의 효과에 대해 혈청

분석으로 TNF- α 와 IL-1 β 억제능이 있다는 것을 보고하였고, 이 등⁵⁾은 봉독약침이 류머티스성 관절염 환자의 관절통증, 종창 및 급성 염증반응에 효과가 있다는 것을 발표하였다.

한편 type II collagen은 관절연골에 있는 특이한 종류의 collagen으로 생쥐에게 주사하면 관절염(CIA : collagen induced arthritis)을 유발하는 것으로 알려져 있어 CIA는 adjuvant arthritis와 함께 류머티스성 관절염의 동물모델로 사용되고 있다²⁰⁾. Type II collagen을 쥐에게 피내주사하여 관절염이 발생함을 1977년 Trentham 등²¹⁾이 처음 보고한 이래 齧齒類에서 type II collagen 유발관절염은 인위적으로 발생시킨 만성 다발성 관절염으로 임상적으로 관절의 發赤, 腫脹, 軟骨 및 뼈의 破壞, 관절강의 섬유화, 관절강직, 관절변형, 발의 두께 증가, 가벼운 체중의 감소 등의 증상을 나타내며 조직학·면역학적으로 사람의 류머티스성 관절염과 유사하여 이 질환의 발생기전과 병태연구에 많이 이용되고 있다²²⁾.

저자는 이와 같은 이론적 근거를 토대로 농도별 봉독약침이 류머티스성 관절염 치료에 있어서의 항염증 효과 및 염증진단계 물질들의 변화에 미치는 영향을 관찰할 목적으로, 수종의 농도별 봉독약침액을 사용하여, *in vitro*에서 type II collagen으로 관절염을 유발시킨 암컷 DBA 생쥐에서 무릎 윤활관절세포를 적출 및 배양하여 NF- κ B 활성화관련 cytokine인 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현양상을 조사하고, *in vivo*에서 동일 관절염 유발 생쥐의 犢鼻穴(ST₃₅)에 해당하는 부위에 4,000:1 봉독약침액(BV-L) 및 2,000:1 봉독약침액(BV-H)의 두 가지 농도의 봉독약침을 각각 시술한 후, 발 두께의 비교 및 윤활관절막 내의 조직화학염색을 통한 섬유화의 변화를 관찰하고, 면역조직화학적 염색을 통해서 MIF, TNF- α , MMP-9의 분포변화 및 NF- κ B, iNOS, COX-2의 분포변화를 조사하였다.

RA 유발 시 윤활관절막의 두께 비후는 자유면에 위치한 윤활분비세포 또는 섬유모세포유사윤활세포(fibroblast like synoviocyte; FLS)의 세포과형성으로 기인된 것으로 MIF 활성화에 의한 세포분열의 촉진과 세포자기살해의 억제의 결과이다. MIF는 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 류머티스성 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다⁹⁾. FLS의 증가는 IL-1 β , IL-2, cell adhesion molecular (CAM)을 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈

관신생성 증가와 섬유화 및 염증부위로의 이주세포 증가를 유도한다²³⁾. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1 β 신호기전에 의한 것으로 collagen fiber의 합성촉진과 collagenase의 합성 또한 유도하고²⁴⁾, 관절염 유발 시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용²⁵⁾, 관절 내 연골과 연골하골조직의 파괴²⁶⁾ 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다²⁷⁾.

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에서 단백분해효소인 MMP생성을 유도하는데, MMP-9는 laminin과 type IV collagen을 선택적으로 분해하여 기저막을 파괴하여 염증관련 세포이주를 용이하게 한다¹²⁾. 또 MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에 의한 TNF- α 의 분비 증가를 일으키며, 이러한 TNF- α 같은 전염증효소의 생성^{28,29)}은 inhibitor인 I κ B protein들과 결합하고 있어 불활성화된 상태로 세포질에 존재하는 NF- κ B의 세포 내 작용을 유도한다³⁰⁾. I κ B kinase로 알려진 IKK (IKK α , β)에 의해서 일어나는 I κ B protein의 인산화는 IKK의 활성화가 다양한 자극에 의해 유도되며, I κ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로써 인산화된 I κ B protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해된다. I κ B protein이 인산화 되어 분해됨으로써 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site (consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자의 발현을 유도한다³¹⁾. 염증 시 전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 pro-inflammatory cytokine과 과도한 oxidative stress에 활성화 되어, 혈관투과성의 증가를 유도하는 iNOS와 prostaglandin 분비에 관여하는 COX-2의 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도한다³²⁾.

iNOS(inducible nitric oxide synthase)는 ROS (reactive oxygen species)의 일종인 산화질소(NO)를 생성하는데, 산화질소는 세포 내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질이 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증이 의한 조직 손상을 가속화시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고³³⁾, 이는 세포막지질을 peroxidation시키며, thiorl, SH기를 oxidation하여 세포독성을 유발한다³⁴⁾. 또한

단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포대사에 중요한 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다³⁵⁾. 유도성 동종효소로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX (cyclooxygenase)-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다³⁶⁻³⁸⁾.

본 실험에서는 type II collagen 유발 관절염을 일으킨 생쥐의 무릎 윤활관절세포를 적출 및 배양하여 시행한 *in vitro* 실험에서 봉독 약침액이 처리된 윤활관절세포에서는 NF- κ B 활성화 관련 cytokine, 즉 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현량이 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 이는 봉독약침이 윤활관절세포에서 NF- κ B 활성을 억제하고 그로 인해 염증 효소의 생성을 억제하는 것으로 사료된다. *in vivo* 실험에서 동일관절염 유발 생쥐의 유발된 쪽 슬관절부의 인체의 犢鼻穴(ST₃₆)에 상응하는 부위에 4,000 : 1 봉독약침액(BV-L) 및 2,000 : 1 봉독약침액(BV-H)으로 각각 약침 처리한 후 살펴본 결과, 시행된 전체 실험에 있어서 BV-H의 효과가 BV-L의 효과보다 높았다. 발 두께의 변화를 볼 때, 정상군에 비해 대조군에서는 부종에 의한 발 두께가 크게 증가하였는데, 봉독약침을 시술한 BV-L군과 BV-H군에서도 발의 두께가 증가하였지만 대조군보다는 증가가 적었으며, 특히 BV-H군은 BV-L군에 비하여 전 실험 기간 동안 유의성 있는 발 두께 증가 감소를 보였다. 윤활관절막의 일반적인 형태변화에서도 봉독약침을 시술한 BV-L군과 BV-H군에서 대조군에 비해 윤활관절막의 자유면 두께 감소, 침윤 림프구 감소, 모세혈관 분포 감소 등이 관찰되었다. 또한 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소하여 정상군에서 관찰되는 윤활관절막과 같은 매끄러운 표면상태로 관찰되었다. 특히 BV-H군이 BV-L군에 비하여 정상군과 유사한 형태로 관찰되었다. 윤활관절막 내 섬유화의 변화에서도 CIA 유발군에서는 섬유화와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적 증가가 관찰되고, 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 일어났지만, 봉독약침을 시술한 BV-L군과 BV-H군에서는 낮은 섬유화가 관찰되었으며, collagen섬유는 윤활관절막 자유면 기저부에서만 분포하고, 섬유화 주변에 침적하는

섬유모세포의 수도 적었다. 특히 이런 섬유화 양상은 BV-L군보다는 BV-H군에서 잘 나타났다. 윤활관절막 내 RA 초기 유발 관련 cytokine인(MIF, TNF- α , MMP-9)의 활성변화를 영상분석해 본 결과, MIF 양성반응은 대조군은 정상군에 비하여 1,493% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 17%, 46% 감소하였으며 BV-H군이 BV-L군보다 35% 감소하였다. TNF- α 양성반응은 대조군이 정상군에 비하여 436% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 22%, 64% 감소하였으며, BV-H군이 BV-L군보다 54% 감소하였다. MMP-9 양성반응은 대조군은 정상군에 비하여 686% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 48%, 61% 감소하였으며 BV-H군이 BV-L군보다 25% 감소하였다. 염증유발유전자들을 조절하는 전사인자인 NF- κ B와 염증효소인 iNOS, COX-2의 활성과 관련한 영상분석에서는 NF- κ B p65 양성반응은 대조군은 정상군에 비해 696% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 6%, 73% 감소하였으며 BV-H군이 BV-L군보다 71% 감소하였다. iNOS 양성반응은 대조군은 정상군에 비하여 795% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 29%, 68% 감소하였으며 BV-H군이 BV-L군보다 58% 감소하였다. COX-2 양성반응은 대조군은 정상군에 비하여 2,006% 증가하였고, BV-L군과 BV-H군은 대조군에 대해 각각 75%, 88% 감소하였다. 또한 BV-H군이 BV-L군보다 53% 감소하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 류머티스성 관절염과 유사한 만성 관절염의 실험모델인 type II collagen 유발 생쥐 모델의 犢鼻穴(ST₃₅)에 해당하는 부위에 두 가지 농도의 봉독약침을 처치하여 슬관절 활액막의 변화를 관찰한 결과, 봉독약침은 농도 의존적으로 MIF의 활성을 억제하여, TNF- α 의 생성을 억제함으로써 NF- κ B의 활성을 저해하였다. 따라서 염증효소인 iNOS와 COX-2의 작용을 차단하게 되어 염증으로 유발되는 윤활관절막 내의 조직 손상을 막았다. 즉 MIF 활성억제를 통한 초기 RA의 진행을 차단하고, NF- κ B의 활성억제를 통한 과도한 염증작용을 조절함으로써 윤활관절세포의 조직 손상을 완화시키는 치료효과를 발휘하는 것으로 생각되며, 특히 농도 의존적인 효과가 기대된다.

본 연구의 내용 중 발 두께를 비교하는 그래프(Fig. 2-A)를 보면 관절염 유발 제7일째, 즉 봉독약침을 사용하지 제5일째부터 2,000:1 봉독약침의 효과는 다른

두 실험군과 현저한 차이를 나타내었다. 계속해서 부종과 염증이 일어나는 대조군과 비교하면, 부종과 염증이 차단되고 회복세로 돌아서는 것을 확인할 수 있었다. 2,000:1 봉독약침을 사용한 제19일째(CIA유발 제21일째)는 정상군(NOR군)과 거의 같은 수준으로 부종과 염증이 가라앉은 상태를 보였다. 앞으로 더 높은 농도의 봉독약침 실험을 통하여 최고의 효과를 발휘하는 봉독약침의 농도를 찾거나, 투여되는 봉독의 양을 증량하는 방식의 적절한 증량패턴을 찾아서 임상에서 사용될 안정적이고 효율적인 봉독약침 프로토콜이 만들어지기를 기대한다. 그리고 항염증에 대한 봉독약침의 효과 이외의 다른 봉독효과에 대해서도 효율적이면서 안전한 봉독약침의 농도 및 증량방식과 약침시술부위에 대하여 현재 임상에서 사용되는 봉독의 종류, 채취시기 및 약침을 주사하는 빈도, 주사방법 등을 변수로 하여 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

농도별 봉독약침의 류머티스성 관절염에 대한 치료효과를 조사하기 위하여 type II collagen 유발 관절염 생쥐 모델에서 윤활관절막의 세포를 배양하여 여러 농도의 봉독약침액으로 각각 처치한 후 NF- κ B 활성 관련 Cytokines (IKK, iNOS, COX-2)의 유전자 발현을 조사하였고, 관절염이 유발된 동일 생쥐 모델의 인체에 상응하는 犢鼻穴(ST₃₅)에 4,000:1 과 2,000:1의 두 가지 농도의 봉독약침을 시술한 후 발 두께 변화, 윤활관절막의 일반적인 형태변화, RA 관련 초기 cytokine 활성변화, NF- κ B 활성변동에 따른 염증반응 변화를 관찰하였다.

1. 봉독약침액이 처리된 윤활관절세포에서는 NF- κ B 활성 관련 cytokine 즉, IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현이 모두 농도 의존적으로 감소하였다.
2. 봉독약침이 실시된 생쥐에서 발 두께 감소, 윤활관절 손상 감소, 윤활관절막 내 섬유화 감소, RA 관련 초기 cytokine (MIF, TNF- α , MMP-9) 활성감소, NF- κ B 활성억제를 통한 항염증작용 (iNOS와 COX-2 감소)이 일어났다. 이러한 변화는 4,000:1 봉독약침에 비하여 2,000:1 봉독약침 시술에서 더 높게 나타났다.

3. 봉독약침은 NF- κ B 활성화제를 통해 과도한 염증작용을 조절함으로써 류머티스성 관절염으로 기인된 관절 손상을 완화시키는 것으로 사료되며, 농도 의존적인 효과가 관찰되었다.

VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 : 175-89.
2. 최홍식, 권오성, 이준희, 강운호. 역절풍에 관한 연구. 서울 : 동국대 한의학연구소논문집. 1996 ; 5 : 97-129.
3. 이홍석, 이재동, 고희균. 최근 10년간 국내의 봉독 관련 연구에 대한 고찰. 2003 ; 20(3) : 154-65.
4. 김태우, 최도영, 이재동. 봉독약침이 제2형 콜라겐 유도 관절염에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(2) : 92-104.
5. 이상훈, 이현중, 백용현, 김수영, 박재경, 홍승재, 양형인, 김건식, 이재동, 최도영, 이두익, 이운호. 봉독약침이 류마티스 관절염 환자의 관절 통증, 종창 및 급성 염증 반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2003 ; 20(2) : 77-84.
6. 김호연. 류마티스관절염치료의 최근경향. 대한내과학회지. 1996 ; 5(4) : 271-9.
7. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. Harrison's principle of internal medicine, 16th ed. New York : McGraw Hill. 2005 ; 1968-77.
8. Leo AB Joosten, Monique MA Helsen, Fons AJ van de Loo, Wim B van DE Bern. Anti-cytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/a mice. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
9. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. J Internal medicine. 2005 ; 35 : 419-26.
10. Marc Feldmann, Fionula M Brennan and Ravinder N Maini. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-440.
11. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1273-80.
12. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases ; role in arthritis. Front Biosci. 2006 ; 11 : 529-43.
13. Matthew H Ornstein and Kirk Sperber. The antiinflammatory and antiviral effects of hydroxychloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(1) : 157-61.
14. Pincus T, Marcum SB, Collahan LF. Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practice. II. Second line drugs and prednisone. J Rheumatol. 1992 ; 19 : 1885-94.
15. 홍원식. 校勘直譯 黃帝內經靈樞. 서울 : 傳統文化研究院. 1994 : 234-7.
16. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1986 : 566-9.
17. 舍岩. 舍岩道人鍼灸要訣. 서울 : 행림출판사 : 1982 : 117-122.
18. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編. 鍼灸學 上. 서울 : 集文堂. 1998 : 381-2.
19. 윤현민, 안창범, 조은진. 봉침요법에 대한 고찰 및 국내 연구동향. 동의대학교 한의학연구소. 2001 ; 5 : 23-42.
20. Suar JM, Cremer MA, Townes AS and Kang AH. Type II collagen induced arthritis in rats : Transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. J Exp Med. 1982 ; 155 : 1-16.
21. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen : An experimental model of arthritis. J Exp Med. 1977 ; 146 : 857-68.
22. 박동준 外. 흰 쥐의 제2형 collagen유발 관절염의 IgG 항 collagen 항체의 변화. 대한내과학회지. 1991 ; 41(13) : 423-8.
23. Carlene T, Luis AD, Nora GS, Lan LL, Antia HK, Raj M, Brian JN, Leslie JC, David AF. Responsive of human T lymphocytes to bacterial superantigens presented by cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. Arthritis & rheumatism. 1996 ; 39(1) : 125-36.

24. Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 ; 78(4) : 2474-7.
25. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 ; 83(22) : 8749-53.
26. Saklatvala J. Interleukin 1: purification and biochemical aspects of its action on cartilage. *J Rheumatol*. 1987 May ; 14 Spec No : 52-4.
27. Bunning R, Crawford A, Richardson H, Opendakker G, van Damme J, and Russel R. IL-1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1987 ; 924 : 437-49.
28. Corsini E, Sangha N, Feldman SR. Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1997 ; 13(4) : 147-52.
29. Yarosh D, Both D, Kibitel J, Anderson C, Elmets C, Brash D, Brown D. Regulation of TNFalpha production and release in human and mouse keratinocytes and mouse skin after UV-B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000 ; 16(6) : 263-70.
30. Tanaka K, Hasegawa J, Asamitsu K, Okamoto T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor kappaB inhibitor, parthenolide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 ; 315(2) : 624-30.
31. Baeuerle PA and Baltimore D. NF-kB - Ten years after. *Cell*. 1996 ; 87 : 13-20.
32. Baeuerle PA. IκB-NF-κB structure: at the interface of inflammation control. *Cell*. 1998 ; 95 : 729-31.
33. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994 ; 9 : 1199-206.
34. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991 ; 288(2) : 481-7.
35. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 ; 91(26) : 12383-7.
36. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 1993 ; 17(2) : S38-40.
37. HJ Rothkötter, R Pabst and M Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immunopath*. 1999 ; 72 : 157-65.
38. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998 ; 93(5) : 705-16.