

원저

## 接骨木추출물 및 약침액에 의한 MIF 활성화 조절능이 생쥐의 제2형 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향

이동건 · 김은정 · 이은솔 · 왕개하 · 조현석 · 이승덕 · 김갑성 · 김경호

동국대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### Effect of Suppressing the Activation of Macrophage Migration Inhibitory Factor by *Sambucus williamsii* HANCE Extract & Pharmacopuncture Solution on Type II Collagen-induced Arthritis

Lee Dong-gun, Kim Eun-jung, Lee Eun-sol, Wang Kai-hsia, Cho Hyun-seok, Lee Seung-deok, Kim Kap-sung and Kim Kyung-ho

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

**Objectives** : The purpose of this study is to evaluate effect of suppressing the expression of cyclo-oxygenase-type-2 (COX-2) as a consequence of inhibition macrophage migration inhibitory factor (MIF) activation by *Sambucus williamsii* Hance (SWH) pharmacopuncture on rheumatoid arthritis (RA).

**Methods** : In vitro test, synoviocytes extracted from type II collagen-induced arthritis (CIA) mouse's knee joint were cultivated. After that, each well of synoviocytes was mixed with the extract of SWH at the dosage of 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, and 1.0 mg/ml respectively, and cultivated for 24 hours after the addition. Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) is used to investigate the expression of MIF, Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , COX-2 mRNA.

*In vivo* test, thirty DBA female mice were used, and each ten mice were allocated into three group; normal group, CIA-elicited group, and group treated with SWH pharmacopuncture on it's the point of ST<sub>35</sub> after CIA elicitation. It is investigated that change of mice foot thickness, histologic change of sliced synovial joint of mouse, and extent change of MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2 in synovial membrane.

**Results** : *In vitro* test, the expressions of cytokine(MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2) mRNAs related to RA were dose-dependent decreased. In the SWH pharmacopuncture group, foot thickness and histologic change of

· 접수 : 2012. 2. 6. · 수정 : 2012. 2. 11. · 채택 : 2012. 2. 13.  
· 교신저자 : 김경호, 경상북도 경주시 동대로 87 동국대학교 부속경주한방병원 침구과  
Tel. 054-770-1200 E-mail : omdkkh@hamail.net

sliced synovial joint were decreased comparing with CIA-elicited group's change. In the SWH pharmacopuncture group, the suppression of MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2 in synovial membrane was clearly shown comparing with CIA-elicited group's change.

**Conclusions** : It might be suggested that SWH pharmacopuncture mitigate tissue damage originated from rheumatoid arthritis by suppressing the expression of COX-2 as a consequence of inhibition MIF activation.

**Key words** : *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub>, pharmacopuncture, rheumatoid arthritis, collagen induced Arthritis

## I. 서 론

류마티오이드 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 인구의 0.8% 정도에서 유발되는 원인 불명의 만성적인 전신성 질환으로<sup>1,2)</sup>, 만성 진행성 활막의 염증과 관절 구조의 파괴가 생기며 유전적 소인이 있는 숙주에서 다양한 면역반응을 나타내는 질환이다<sup>2)</sup>.

류마티오이드 관절염에서 처음 이상면역반응을 유발시키는 인자가 무엇인지는 정확하게 밝혀져 있지 않으나 병의 진행에는 면역학적 이상이 중요한 역할을 한다는 증거들이 많이 있다<sup>3)</sup>. 즉 순환액 내의 type II collagen 역가 증가<sup>4)</sup>, macrophage migration inhibitory factor (MIF)의 증가<sup>5)</sup>, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )의 증가<sup>6,7)</sup>, 염증성 전사인자인 Nuclear factor (NF- $\kappa$ B) 활성화와 염증효소 cyclo-oxygenase-type-2(COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가<sup>8,9)</sup>, 단백질분해효소 matrix metalloproteinase (MMP)의 증가<sup>10,11)</sup> 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도한다.

한의학에서 문헌적으로 기술된 증상으로 볼 때 류마티오이드 관절염은 痺, 風痺, 痛風, 歷節風, 白虎風, 白虎歷節風 등의 범주에 속한다<sup>12)</sup>. 원인은 外因으로 風寒濕의 六淫之氣, 환경적인 요소와 內因으로는 七情과 臟腑의 불균형으로 인한 痰濕과 瘀血의 병리적 산물이 관여한다<sup>13)</sup>.

接骨木(*Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub>: SWH)은 忍冬科 식물인 接骨木의 莖枝로서 性味가 甘苦하고 平하

며, 祛風, 利濕, 活血, 止痛하는 효능이 있어 風濕筋骨疼痛, 腰痛, 水腫, 風癢, 癰疹, 產後血暈, 跌打腫痛, 骨折, 創傷出血 등에 사용할 수 있는 本草이다<sup>14)</sup>. 류마티오이드 관절염에 사용된 藥鍼에 대한 기존의 보고는 많으나, 接骨木藥鍼이 MIF 활성억제를 통해 TNF- $\alpha$ 의 분비 유도가 억제되고 염증효소 COX-2 작용을 차단하게 되어 류마티오이드 관절염으로 유발되는 순환관절막 내 조직 손상을 완화시키는 치료효과에 대한 연구는 살펴볼 수 없었다.

이에 저자는 제2형 collagen 유발 관절염 model의 생쥐를 대상으로 하여, *in vitro*상에서 接骨木抽出物이 류마티오이드 관절염 관련 cytokine (MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2) mRNA 유전자발현에 미치는 영향을 조사하였고, *in vivo*상에서 인체의 犢鼻(ST<sub>35</sub>)에 상응하는 부위로 接骨木藥鍼을 시술한 후 足蹠浮腫의 변화, 순환관절막의 일반적인 형태변화, 순환관절막 내의 MIF, TNF- $\alpha$ 와 COX-2의 생성 변화를 관찰하여 초기 류마티오이드 관절염의 완화 효과에 관한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

오리엔트(한국)에서 분양 받은 태령 6주된 DBA 암컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 약침기

약침액 주입기는 10  $\mu$ l의 Hamilton syringe (Sigma, USA)를 사용하였다.

3) 추출물의 제조

接骨木 200 g을 증류수 500 ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 감압, 농축한 후 동결 건조시켜 접골목 추출물 15.94g(수득률 7.98%)을 얻어 실험에 사용하였다.

4) 약침액의 제조

接骨木 약침액은 GMP 기준에 따른 설비가 되어 있는 대한약침학회(서울, 한국)를 방문하여 接骨木 세척 및 침출, 接骨木 달이기(약재 200g, 증류수 1.4  $\ell$ ), 증류 냉각액 모으기, 여과(0.1  $\mu$ m cellulose 여과막 사용), 등장액 조절, 무기염류 제거 및 pH 조절, 밀봉, 고압 멸균(2기압, 121 $^{\circ}$ C) 후 포장순의 공정으로 제조하였다.

2. 방법

1) 염증유도 산화스트레스 완화효과조사

항산화 능력을 측정하기 위해 riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mM buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100  $\mu$ l, EDTA/cyanide 200  $\mu$ l, riboflavin 100  $\mu$ l 및 항산화 정도를 측정할 농도별(0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml) 接骨木추출물 100  $\mu$ l을 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 10번 반복하여 평균값을 계산하였다.

2) *In vitro*에서 관절염 관련 cytokine 유전자 발현 조사

(1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 생쥐 무릎 윤활관절세포는 관절염이 유발된 암컷 DBA 생쥐 무릎관절에서 적출하였다. 우선 관절주변 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 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 처리 한 다음 3,000 rpm에 5 분간 원심분리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  incubator에서 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma, USA)이 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin (Sigma, USA), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, trypsin-EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3~5회 계대배양 세포를 사용하였다.

(2) 유전자발현 조사를 위한 RT-PCR

接骨木추출물의 첨가량 결정을 위해 MTT assay를 실시하였는데, 接骨木추출물 10 mg/ml까지는 세포 생존율의 변화가 일어나지 않아 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다. 接骨木抽出物이 류마티오이드 관절염 유발을 주도하는 cytokine인 MIF, 전염증효소 TNF- $\alpha$  및 염증효소인 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 윤활관절세포 - 5 $\times$ 10 $^5$  cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에

Table 1. The Primer of MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2 and  $\beta$ -actin mRNA

| Primer         | Primer sequences                           | Product(bp) | No. of cycles |
|----------------|--|-------------|---------------|
| MIF            | Sense 5'-CACCATGCCTATGTTTCATCGTGAACA-3'    | 404         | 35            |
|                | Antisense 5'-GGGCTCAAGGCGAAGGTGGAACCGTT-3' |             |               |
| TNF- $\alpha$  | Sense 5' TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG 3'     | 364         | 35            |
|                | Antisense 5' CCT GTA GCC CAC GTA GTA GC 3' |             |               |
| COX-2          | Sense 5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'           | 624         | 35            |
|                | Antisense 5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'       |             |               |
| $\beta$ -actin | Sense 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'         | 840         | 35            |
|                | Antisense 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3' |             |               |

MIF : macrophage migration inhibitory factor. TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ . COX-2 : cyclooxygenase-2.

phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 1 ng/ml)를 1시간 처리하여 RA 관련 cytokine mRNA 발현을 유도하였다. 接骨木추출물 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양한 후, 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 MIF, TNF- $\alpha$  그리고 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. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2 (Optima, USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 통해 비교하였다.

### 3) *In vivo*에서 MIF 활성화 조절 및 COX-2 생성억제에 의한 조직손상 완화 관찰

#### (1) 실험동물군의 분류

관절염을 유발하지 않은 정상군, collagen-induced arthritis (CIA) 유발한 대조군, CIA 유발 후 接骨木藥鍼을 투여한 실험군(SWH군)으로 나누었으며, 각 군에 10마리씩 배정하였다.

#### (2) 항원제조와 콜라겐유도 관절염(CIA)의 유발

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

#### (3) 接骨木藥鍼의 시술

CIA 유발 3일부터 21일까지 接骨木약침액 50  $\mu$ l/kg을 인체의 犢鼻穴(ST<sub>35</sub>)에 상응하는 CIA 유발 생쥐

의 슬관절부위에 Hamilton syringe (Sigma, USA)를 이용하여 매일 시술하였다.

#### (4) 윤활관절 표본 제작

CIA 유발 후 21일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 윤활관절막의 자유면 기저부에서 모세혈관의 분포 변화를 조사하기 위해서 mallory azan 염색을, 윤활관절막 내 섬유화를 조사하기 위해 van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 실시하였다.

#### (5) 윤활관절막 내 COX-2 생성억제 기전 조사

##### ① MIF활성 변화관찰

초기 CIA 유도 cytokine인 MIF의 윤활관절막 내 분포변화를 조사하기 위해 항체를 이용한 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 rabbit anti mouse MIF (1:200, Santa Cruz Biotec, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat anti-rabbit IgG (DAKO)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex (DAKO)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

##### ② TNF- $\alpha$ 활성 변화관찰

전염증효소인 TNF- $\alpha$ 활성 변화를 조사하기 위해 mouse anti-mouse TNF- $\alpha$  (1:500, Santa Cruz Biotec, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

##### ③ COX-2생성 변화관찰

COX-2의 조직 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse COX-2 (1:500, Santa Cruz Biotec, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### 4) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 수치화를 위해 optimas 5.2를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 본 실험의 결과는 ANOVA test (SPSS14KO, SPSS. USA)를 통해 검증하였으며 신뢰도 95% 이상( $p < 0.05$ )일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 항산화효과

接骨木추출물의 항산화 효율은 0.2 mg/ml에서  $18 \pm 0.7\%$ , 0.4 mg/ml에서  $36 \pm 0.6\%$ , 0.6 mg/ml에서  $43 \pm 0.8\%$ , 0.8 mg/ml에서  $55 \pm 1.3\%$  및, 1.0 mg/ml에서  $70 \pm 1.9\%$ 로 농도-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

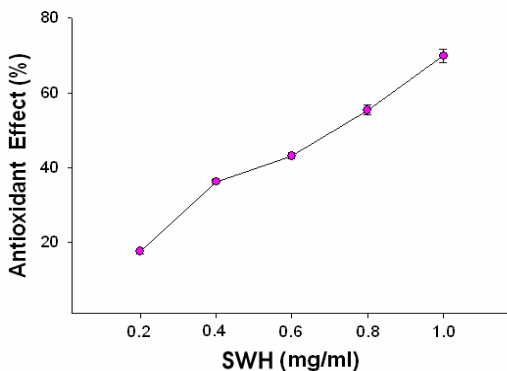


Fig. 1. The anti-oxidant effect of *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub>(SWH) extract  
The SOD ability of SWH were dose-dependantly increased.

#### 2. 관절염 관련 cytokine 유전자 발현

##### 1) MIF 유전자발현 억제

PMA 자극으로 유도된 윤활관절세포에서의 MIF mRNA 발현은 증가하였으며, 실험군에서는 PMA 자극 시 발현되는 MIF mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 17%, 0.6 mg/ml서 23%, 0.8 mg/ml에서 32% 및 1.0 mg/ml에서 58%로 각각 감소함으로써 실험군인 SWH군에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2).

##### 2) TNF- $\alpha$ 유전자발현 억제

PMA 자극으로 유도된 윤활관절세포에서의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 증가하였으며, 실험군에서는 PMA 자극 시 발현되는 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 31%, 0.6 mg/ml서 45%, 0.8 mg/ml에서 50% 및 1.0 mg/ml에서 68%로 각각 감소하므로써 실험군인 SWH군에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2).

##### 3) COX-2 유전자발현 억제

PMA 자극으로 유도된 윤활관절세포에서의 COX-2 mRNA 발현은 증가하였으며, 실험군에서는 PMA 자극 시 발현되는 COX-2 mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 5%, 0.6 mg/ml서 14%, 0.8 mg/ml에서 17% 및 1.0 mg/ml에서 54%로 각각 감소함으로써 실험군인 SWH군에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2).

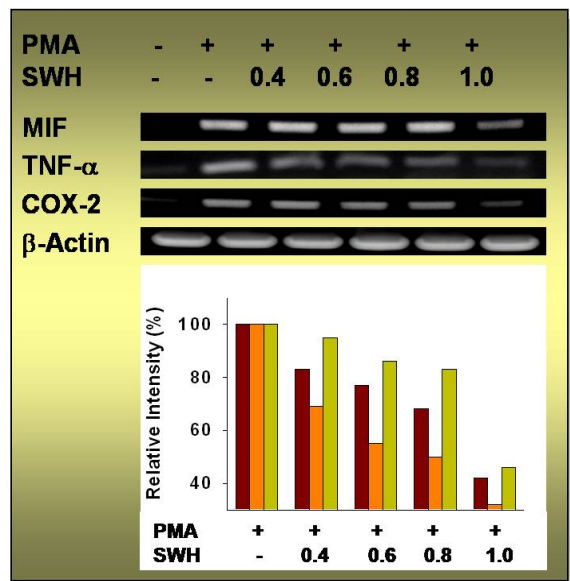


Fig. 2. Inhibition of MIF, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA expression by *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub> (SWH) extract

The synoviocytes cells were treated with PMA for 1 hour prior to the addition of indicated concentrations (0.4, - 1.0 mg/ml) of SWH extract, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced MIF (■), TNF- $\alpha$  (■) and COX-2 (■) mRNA expression were dose-dependantly decreased in SWH extract treated synoviocytes.

PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate.

MIF : macrophage migration inhibitory factor.

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

COX-2 : cyclooxygenase-2.

### 3. CIA 생쥐에서 MIF 활성조절 및 COX-2 생성억제에 의한 조직손상 완화

#### 1) 발 두께 변화

정상군에 비해 대조군이 제7일차(4.35± 0.13mm)에서 부종이 심하게 증가하였다. 실험군은 대조군에 비하여 제7일(3.56±0.12mm), 14일(3.03±0.09mm) 및 제21일(2.29± 0.13mm)차에서 각각 유의성(p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Inhibition of Foot Thickness in Collagen Induced Arthritis (CIA) Evoked Mouse by *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub> (SWH) Pharmacopuncture Solution

| Objective | Group     |           |            |
|-----------|-----------|-----------|------------|
|           | NOR       | CON       | SWH        |
| 1st day   | 1.84±0.03 | 1.83±0.06 | 1.84±0.04  |
| 7th day   | 1.85±0.06 | 4.35±0.13 | 3.56±0.12* |
| 14th day  | 1.84±0.06 | 3.83±0.10 | 3.03±0.09* |
| 21th day  | 1.83±0.03 | 3.04±0.12 | 2.29±0.13* |

(mm)

M ± S.D : mean ± standard deviation.

NOR : No-treated group. CON : CIA elicitate group.

SWH : SWH pharmacopunctured group after CIA elicitation.

\* : p < 0.05 compared with CON.

#### 2) 일반적인 형태 변화

관절염 유발 후 윤활관절막의 자유면 (apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활관절세포 과형성으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께증가였다. 윤활강 쪽으로 많은 돌기를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활관절세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 자유면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 자유면쪽으로 침윤하는 림프구의 증가도 관찰되었다. 그러나 실험군(SWH군)에서는 윤활관절막의 자유면 두께증가가 감소하였다. 윤활강쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소한 것으로 관찰되어, 대체적으로 윤활관절막이 매끄러운 표면상태로 관찰되었다. 또한 윤활관절막 자유면쪽으로 림프구 침윤도 줄었다(Fig. 3A).

#### 3) 윤활관절막 내 혈관분포 감소

정상군의 윤활관절막 내 지방조직 사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 관절염 유발 후 증가되는 양상을

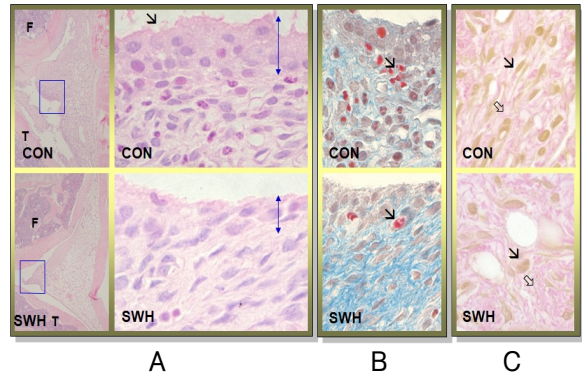


Fig. 3. Mitigation effects of CIA by *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub> (SWH) pharmacopuncture solution

A : inhibition of damaged synovial membrane as hyperplasia (↓) and infiltration of inflammation intricate cells (H&E, L. × 40; R. enlargement of box of L. photo, × 1,000).

B : inhibition of angiogenesis (arrow, mallory azan stain, × 1,000).

C : inhibition of fibrosis (arrow, fibroblast; Van Gieson's, × 1,000).

CON : CIA elicitate group.

SWH : SWH pharmacopunctured group after CIA elicitation.

F : femur. T : tibia. Vacant arrow, collagen fiber.

보였는데, 특히 윤활관절막의 자유면 기저부의 윤활세포주변에서 직경이 큰 모세혈관의 출현이 증가하였다. 그러나 실험군(SWH군)에서는 일부 윤활관절막의 자유면에서만 모세혈관의 급속한 출현 증가가 관찰되었을 뿐, 그외 지역에서는 정상군과 유사한 분포양상을 보였다(Fig. 3B).

#### 4) 윤활관절막 내 섬유화 감소

관절염 유발 후 윤활관절막 내 주된 형태학적 변화 중 하나는 섬유화와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적 증가였다. 섬유화는 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 관찰되었고, 이런 섬유화 부위에서는 세포가장자리가 잘 발달된 섬유모세포의 분포가 증가하였다. 그러나 실험군(SWH군)의 윤활관절막 자유면에서는 낮은 섬유화가 관찰되었다. 섬유화는 지방층 사이의 모세혈관주변부에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었으며, 섬유화주변에 침적된 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 3C).

#### 5) 윤활관절막 내 MIF 활성

MIF의 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 실험군(SWH군)에서는 감소하였다. 이런 MIF 양성반응세포는 윤활관절막 자유면에 분포하

였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 534% 증가하였으나, 실험군(SWH군)은 577±13 particles로서 대조군 1681±72 particles에 비해 66% 감소함으로써 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 4A).

### 6) 윤활관절막 내 TNF- $\alpha$ 생성억제

전염증효소 TNF- $\alpha$ 의 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 실험군(SWH군)에서는 감소하였다. 이런 TNF- $\alpha$  양성반응세포는 윤활관절막 자유면에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF- $\alpha$  양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 444% 증가하였으나, 실험군(SWH군)은 1264±45 particles로서 대조군 1963±58 particles에 비해 36% 감소함으로써 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 4B).

### 7) 윤활관절막 내 COX-2 생성억제

염증효소인 COX-2의 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 실험군(SWH군)에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 윤활관절막 자유면에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 578% 증가하였으나, 실험군(SWH군)은 1145±40 particles로서 대조군 2720±56 particles에 비해 58% 감소함으로써 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 4C).

Table 3. The Image Analysis for Inhibition of Arthritis Intricate Cytokine Production by *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub>(SWH) Pharmacopuncture Solution

| Objective     | Group  |          |           |
|---------------|--------|----------|-----------|
|               | NOR    | CON      | SWH       |
| MIF           | 265±16 | 1,681±72 | 577±13*   |
| TNF- $\alpha$ | 361±70 | 1,963±58 | 1,264±45* |
| COX-2         | 401±17 | 2,720±56 | 1,145±40* |

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)

MIF : macrophage migration inhibitory factor.

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

COX-2 : cyclooxygenase-2.

Other abbreviation same as Table. 2.

\* :  $p < 0.05$  compared with CON.

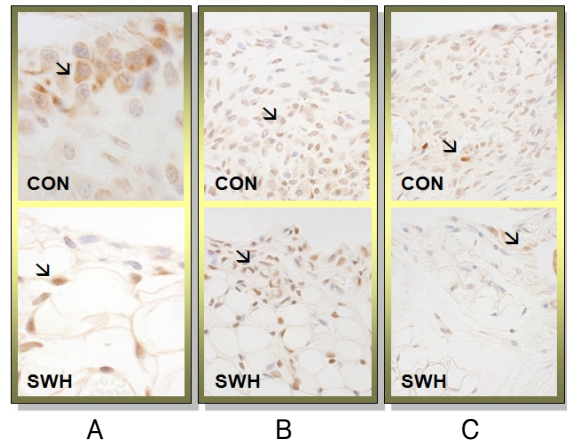


Fig. 4. Inhibition of arthritis intricate cytokine production by *Sambucus williamsii* H<sub>ANCE</sub> (SWH) pharmacopuncture solution

A : suppression of MIF (arrow) activation (MIF immunohistochemistry,  $\times 1,000$ ).

B : inhibition of TNF- $\alpha$  (arrow) production (TNF- $\alpha$  immunohistochemistry,  $\times 400$ ).

C : inhibition of COX-2 (arrow) production (COX-2 immunohistochemistry,  $\times 400$ ).

MIF : macrophage migration inhibitory factor.

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

COX-2 : cyclooxygenase-2.

Other abbreviation same as Fig. 3.

## IV. 고찰

류마티오이드 관절염은 전신적인 만성 염증성 질환으로 간헐적 또는 지속적으로 서서히 또는 급속하게 증세가 나타났다가 없어지는 등 여러 형태의 임상경과를 취하면서 주로 관절을 침범하는 질환이다<sup>2,3)</sup>. 30-40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병률을 보이고 있지만 보통 평균 유병률은 0.8%로 추정되며, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다<sup>1)</sup>.

병의 특성상 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증이 야기되어, pannus에 의한 뼈의 파괴, 윤활관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백질분해효소, O<sub>2</sub> radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 일어난다<sup>10)</sup>. 류마티오이드 관절염은 노화나 퇴행성 변화에 의하여 발생하는 골관절염 다음으로 많은 만성 질환으로, 특정 관절에서만 국한되어 통증이 나타나는 것이 아니라 팔다리 여러 곳을 옮겨 다니며 전신의 관절을 침범하는 것이 특징이다<sup>15)</sup>. 이러

한 류마티스 관절염이 심한 경우 관절증상 이외에 류마티스 결절, 맥관염, 안염증, 신경기능 이상, 심폐기능장애, 림프절병증, 비장거대증 등<sup>16)</sup>의 관절 외 전신 증상이 발생되므로 전신성 질환으로 분류되기도 한다.

단핵구세포의 모임은 그 구성과 크기가 다양한데, 가장 우세하게 침윤하는 세포는 T림프구이다. 주된 세포는 CD8+ T세포(suppressor/cytotoxic)보다 CD4+T세포(helper/inducer)로서 종종 HLA-DR+(Human leukocyte antigen-D-related, 인간 백혈구 항원) 대식세포와 수상돌기세포에 근접하여 발견된다. T세포의 축적 외에도 항체를 생산하는 형질세포로 국소적으로 분화하는 다수의 B세포의 침윤이 특징적으로 나타난다. 이들 세포는 polyclonal 면역글로불린과 자가항체인 류마티스 인자를 생산하여 면역복합체의 국소형성을 초래한다. 또한 활성화된 표현형을 가진 많은 수의 대식세포 역시 류마티스 윤활관절막에서 찾아 볼 수 있다<sup>1)</sup>.

각각에서 분비되는 cytokine을 살펴보면 T림프구에서는 IL-2, IL-6, 파립세포-대식세포 colony 자극요소(GM-CSF), TNF- $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$  등이 분비되며, 활성화된 대식세포에서는 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-csf, macrophage CSF, platelet-derived growth factor, insulin like growth factor, transforming growth factor  $\beta$  등이 분비되며, 그 외에 fibroblast, endothelial cell 등에서 분비되는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF 등<sup>1)</sup>이 있다.

결국 T와 B림프구 및 대식세포가 활성화되면서 다양한 cytokine들을 분비하고 다양한 경로를 통해 활막액과 조직내의 세포에 의해 Cyclo-oxygenase (COX)와 lipoxygenase 과정이 촉진되고 그 결과물의 다량 생성이 염증의 징후와 증상을 두드러지게 하는 것<sup>1)</sup>으로 보고되고 있다.

현재 류마티스 관절염의 치료제로 aspirin, 비스테로이드성 소염제-salicylate-, 단순 소염제, 부신피질호르몬-corticosteroid-, 질환 변형 약제(disease modifying antirheumatic drug : DMARD), 항TNF- $\alpha$  제제-infliximab, etanercept, Adalimumab-, 면역억제제-cyclosporin A, cyclophosphamide, Chloroquine, Methotrexate-, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다. 각각은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

관절염의 대표적 동물실험모델로서 콜라겐 유발 관절염(CIA)이 류마티스 면역학적 기전의 연구와 치료약물의 약리효과를 조사하는데 활용되고 있는데<sup>17)</sup>, collagen은 동물의 진화 과정 중 주위환경의 영향과 기능적 요구에 따라 경직성, 탄성 및 강도가 서로 다른 일련의 단백질이 발달한 것을 말하며, 그 중에서도 제II형 collagen은 관절연골 교원질의 90% 이상을 차지하고 있으며, 연골과피의 표식자로 이용되고 있다. 제II형 collagen을 쥐에게 피내주사하여 관절염이 발생함을 1977년 Trendem<sup>18)</sup> 등이 처음 보고한 이래, 설치류에서 제II형 CIA은 임상적·조직학적·면역학적으로 사람의 류마티스 관절염과 유사하여, 이 질환의 질병과 병태연구에 많이 이용되고 있다<sup>19)</sup>. 따라서 본 실험에서도 이러한 제II형 CIA유발 DBA mouse를 사용하였다.

슬관절과 관련된 治療穴에는 內膝眼·外膝眼(犢鼻)·陽陵泉·膝陽關·梁丘·血海·足三里·鶴膝·委中 등이 있었고, 그 중에서도 임상적으로나 실험적으로 많이 활용하는 犢鼻(ST<sub>35</sub>)는 外膝眼으로도 불리는 足陽明胃經의 經穴로서 무릎인대의 가쪽 오목한 곳에 위치한다. 通經活絡, 消風散寒, 消腫止痛의 효능이 있어, 脚氣, 膝痛, 足浮腫, 족관절 류머티즘, 屈伸不利, 痛風, 膝無力 등의 주치범위를 가지고 있다<sup>20)</sup>. 이에 저자는 슬관절질환에 효과가 좋은 犢鼻(ST<sub>35</sub>)를 선택하여 실험하였다.

接骨木(*Sambucus williamsii* HANCE : SWH)은忍冬科 식물인 接骨木의 莖枝로서 性味が 甘苦하고 平하며, 祛風, 利濕, 活血, 止痛하는 효능이 있어 風濕筋骨疼痛, 腰痛, 水腫, 風痒, 隱疹, 産後血暈, 跌打腫痛, 骨折, 創傷出血 등에 사용할 수 있는 本草이다<sup>14)</sup>.

본 약재가 흥미로운 것은 문헌상 조사에 따르면 風濕筋骨疼痛과 같은 관절염 양상의 질환뿐만 아니라, 骨折 치유에도 응용할 수 있다는 데 있었다. 면역학적 인자인 cytokine의 변화로만 살펴보면, 염증억제기전은 MIF 및 TNF- $\alpha$  등의 변화에 있어서 이를 활성억제시켜야 하지만 골절치유의 기전은 이를 활성화시켜야 하기 때문이다<sup>21-23)</sup>.

최근의 接骨木에 대한 연구들을 살펴보면 차 등<sup>24)</sup>은 진통소염에 미치는 효과를, 유 등<sup>25)</sup>은 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향 등을 보고 하였으나, 제II형 collagen 유발 관절염에 接骨木藥鍼을 활용한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 류마티스 관절염에서 다양한 cytokine의 변화들 중 윤활액내의 type II collagen 역가 증가<sup>4)</sup>,



MIF의 증가<sup>5)</sup>, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ 의 증가<sup>6,7)</sup>, 염증성 전사인자인 Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 활성화와 염증효소 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 증가<sup>8,9)</sup>, 단백분해효소 (matrix metalloproteinase; MMP)의 증가 등<sup>10,11)</sup>이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가가 심각한 관절손상을 유도하는 비정상적인 과민면역반응에 주목하여 연구를 진행하게 되었다.

接骨木의 RA에 대한 치료효과를 조사하기 위해 CIA모델 생쥐를 대상으로 하여 *in vitro* 실험상에서 接骨木추출물의 MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2 mRNA 활성 억제제를 조사하였고, *in vivo* 실험상에서 CIA mouse의 犢鼻(ST<sub>35</sub>)에 接骨木약침을 시술하여 이후 足蹠浮腫, 運轉관절막의 변화와 더불어 運轉관절막 내의 MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2의 변화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

류마티오이드 관절염 유발 시 運轉관절막의 두께 비후는 자유면에 위치한 運轉관절세포 또는 섬유모세포 유사운활세포(fibroblast like synoviocyte; FLS)의 세포과형성으로 기인된 것으로 MIF 활성화에 의한 세포분열의 촉진과 세포자기살해의 억제의 결과이다. MIF는 *in vitro*와 *in vivo*실험을 통해 류마티오이드 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다<sup>5)</sup>. FLS의 증가는 IL-1 $\beta$ , IL-2, cell adhesion molecular (CAM)을 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생성 증가와 섬유화(fibrosis)와 염증부위로의 이주세포의 증가를 유도한다<sup>26)</sup>. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1 $\beta$  신호기전에 의한 것으로 collagen fiber의 합성촉진과 collagenase의 합성 또한 유도하고<sup>27)</sup>, 관절염 유발 시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용<sup>28)</sup>, 관절 내 연골과 연골하 골조직의 파괴<sup>29)</sup> 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다<sup>30)</sup>. 본 실험의 CIA유발군(대조군)에서도 運轉관절막 내에서 FLS의 세포과형성, 혈관신생성 증가, 섬유화 증가를 확인할 수 있었다.

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비 증가를 일으키며, 그 결과 염증관련 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도한다. 전사인자 NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 의해 활성화가 유도되며, 결국에는 염증효소 COX-2의 발현을 증가시켜 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다<sup>31,32)</sup>. 유도성 동종효소(inducible isoform)

로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성 염증질환, 즉 류마티오이드 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다<sup>33,34)</sup>. 본 실험의 CIA 유발군(대조군)에서도 NF- $\kappa$ B 활성화에 의한 COX-2 양성반응세포의 運轉관절막 내 분포 증가를 일으켰다.

이에 반해 실험군(SWH군)에서는 CIA 동물모델의 足蹠浮腫이 유의성 있게 감소하였고 運轉관절막에서 FLS의 세포과형성, 혈관신생성, 섬유화 등이 감소되어 나타났다. 이는 MIF 활성 억제에 의한 것으로 接骨木추출물이 PMA로 자극된 運轉관절세포에서 MIF mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 *in vitro*의 결과와 CIA 동물모델을 통해 接骨木약침 후 MIF 양성반응세포의 유의성 있는 분포감소가 관찰된 *in vivo* 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 接骨木藥鍼의 MIF 활성 억제는 NF- $\kappa$ B 활성을 저해함으로써 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하고 결국, 염증효소 COX-2 작용을 차단하게 되어 염증을 유발되는 運轉관절막 내 조직 손상을 막았다.

이상의 결과로 接骨木약침은 MIF의 활성 억제를 통해 초기 류마티오이드 관절염의 진행을 차단하고 순차적으로 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하고 염증효소인 COX-2 작용을 차단함으로써 항염증작용을 통해 류마티오이드 관절염으로 기인된 조직 손상을 완화시키는 치료 효과를 보이는 것으로 생각된다.

한의학적 원인 및 치료에서 류마티오이드 관절염을 風寒濕熱의 邪氣에 의한 경우와, 正氣의 虛弱에서 비롯된 경우의 두 가지 큰 범주로 나누어 접근하였을 때, 接骨木은 性味가 甘苦하고, 平하며, 祛風, 利濕, 活血, 止痛하는 효능이 있어 風濕筋骨疼痛, 腰痛, 水腫, 風痒, 隱疹, 產後血暈, 跌打腫痛, 骨折, 創傷出血 등에 사용할 수 있는 본초의 특성을 감안하였을 때, 접골목약침은 위의 실험적 결과와 종합하여 風寒濕熱의 邪氣에 의한 류마티오이드 관절염의 치료제로서 보다 더 적합할 것으로 사료된다.

그리고, 接骨木약침을 골절치유 실험 model에 활용하여 조직학적 골절부위의 뼈기질 생성 증가여부와 면역학적으로 MIF, TNF- $\alpha$  등의 cytokine의 변화에 미치는 영향을 연구하여 接骨木약침을 CIA model에 활용하였을 때 얻은 cytokine의 변화와 비교해 보는 것도 흥미로운 것으로 사료된다.

또한 기존의 연구에서 다양한 한약재들이 실험적

결과를 통하여 류마티오이드 관절염에 치료 효과를 보인다는 보고들은 있었지만 각각의 약제의 효능을 서로 비교한 연구는 부족한 실정이다. 앞으로의 연구는 류마티오이드 관절염에 있어 각각의 약제 효능비교를 통해 보다 더 우수한 치료효과의 약제를 선택해 나가는 방향이 필요하다고 생각되며, 이를 바탕으로 실제 환자를 대상으로 한 임상적 연구도 보다 더 활발히 진행해 나가야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

接骨木약침의 MIF 활성 조절을 통한 COX-2 생성 억제제가 류마티오이드 관절염에 미치는 영향을 조사하기 위하여 활성 산소 소거실험을 통한 接骨木추출물의 항산화효과를 확인한 후, *in vitro*상에서 接骨木추출물이 류마티오이드 관절염 관련 cytokine (MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2) mRNA 유전자발현에 미치는 영향을 조사하였으며, *in vivo*상에서 CIA유발 DBA 생쥐에게 인체의 犢鼻(ST<sub>35</sub>)에 상응하는 부위로 接骨木藥침액을 시술한 후 足趾浮腫의 변화, 윤활관절막의 일반적인 형태변화, 윤활관절막 내의 MIF, TNF- $\alpha$ 와 COX-2의 생성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *In vitro*상에서 接骨木抽出物이 처리된 윤활관절 세포에서는 류마티오이드 관절염 관련 cytokine (MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2) mRNA 유전자 발현이 농도의존적으로 감소하였다.
2. *In vivo*상에서 接骨木약침액이 시술된 CIA 유발 생쥐에서 대조군에 비해 足趾浮腫이 유의성 있게 감소하였고, 윤활관절막의 두께감소 및 혈관 분포감소, 윤활관절막 내의 섬유화의 감소를 볼 수 있었다.
3. *In vivo*상에서 接骨木약침액이 시술된 CIA 유발 생쥐에서 대조군에 비해 윤활관절막 내의 MIF, TNF- $\alpha$ , COX-2 양성반응이 유의성 있게 감소하였다.

## VI. 참고문헌

1. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학 16판.

서울 : 도서출판 MIP. 2006 ; 2148-57.

2. 대한정형외과학회. 정형외과학 제6판. 서울 : 최신 의학사. 2006 ; 226, 232-47.
3. 의학교육연수원 편. 가정의학. 서울 : 서울대학교 출판부. 2001 ; 833-9.
4. Leo AB, Monique MA, Fons AJ, van de Loo, Wim B. Anti-cytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/a mice. *Arthritis Rheum.* 1996 ; 39(5) : 797-809.
5. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. *J. Internal medicine.* 2005 ; 35 : 419-26.
6. Leech M, Metz CN, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R. MIF in Rheumatoid arthritis : evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 1999 ; 42 : 1601-8.
7. Marc F, Fionula MB, Ravinder NM. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996 ; 14 : 397-440.
8. 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.
9. Yasmina J, Catalina A, Carmen M, Alicia A, Irene G, Florencia R, Rosa P, Javier L. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res & Therapy.* 2005 ; 7 : R1034-45.
10. Peter S, Stefan S, Rolf M, Peter P. Synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995 ; 22 : 400-5.
11. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. *J Biol chem.* 2000 ; 275 : 444-50.
12. 許浚 著. 東醫寶鑑國譯委員會 譯. 對譯東醫寶鑑. 서울 : 법인문화사 1999 ; 974-84.
13. 권영달, 송용선. 류마티스성 관절염(rheumatoid

- arthritis)에 대한 東西醫學的 考察. 대한한의학회지. 1994 ; 15(2) : 373-96.
14. 新文豊出版公司. 新編中藥大辭典 中. 臺北市 : 新文豊出版公司. 1982 ; 1728-9.
  15. 이재동. 류마티스 관절염의 한방치료. 경희의학. 2004 ; 20(1) : 4-9.
  16. Stephen LD, Koda-Kimble MA. Rheumatic disorders, Applied Therapeutics: the clinical use of drugs. 6th ed. Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, WA : Appl Therap Inc. 1995 ; 1-27.
  17. Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hmaoka T and Fujiwara H. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen induced arthritis. Arthritis Rheum. 1992 ; 32 : 594-600.
  18. Trendam DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen, An experimental model of arthritis in rats. J EXP Med. 1977 ; 146 : 857-68.
  19. Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Collagen induced arthritis in rodent, a review of clinical, histologic feature. Rymachi. 1984 ; 24 : 45-66.
  20. 대한침구학회 교재편찬위원회. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 2008 ; 上 62-3, 下 120.
  21. 이재동, 백용현, 최도영, 허정은, 양하루, 우현수, 박동석. 골유합 촉진 치료제 개발을 위한 수종의 한약재 활성 검색. 대한침구학회지. 2007 ; 24(5) : 13-22.
  22. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. J Biol Chem. 1999 ; 274(25) : 18100-6.
  23. Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2003 ; 48(1) : 103-9.
  24. 차봉오. 접골목이 진통소염에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 1982.
  25. 유학근, 정진홍. 접골목 전탕액이 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000 ; 13(1) : 262-302.
  26. Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of Rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor (IL-1). Proc Natl Acad Sci USA. 1981 ; 78 : 2474-86.
  27. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. IL-1 induces leukocytes infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 ; 83 : 8749-56.
  28. Saklatvala J. IL-1 - Purification and biochemical aspects of its action on cartilage. J Rheum. 1987 ; 14 : 52-8.
  29. Bunning R, Crawford A, Richardson H, Opendakker G, van Damme J, Russell R. IL-1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. Biochem Biophys Acta. 1987 ; 924 : 437-49.
  30. Baeuerle PA. IκB-NF-κB structure: at the interface of inflammation control. Cell. 1998 ; 95 : 729-31.
  31. YX Li, N Li, YS Li, B Wu, JS. Li. Upregulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. Transplant Proceed. 2000 ; 32 : 1283-6.
  32. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. J Hepatol. 1993 ; 17(2) : S38-40.
  33. Rothkötter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. Veterinary Immunology immunopath. 1999 ; 72 : 157-65.
  34. 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.