

## 大防風湯 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

구성태<sup>1</sup> · 황재호<sup>2</sup> · 송문영<sup>2</sup> · 박유리<sup>2</sup> · 손인철<sup>2</sup> · 김경식<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한국한의학연구원 의료연구부, <sup>2</sup>원광대학교 경혈학교실

### Effect of Daebangpungtang herbal acupuncture on the carrageenan-induced arthritis in rats

Sung-Tae Koo<sup>1</sup>, Jae-Ho Hwang<sup>2</sup>, In-Cheul Sohn<sup>2</sup>, Kyoung-Sik Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine

<sup>2</sup>Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### Abstract

**Objectives :** DaeBangPungTang(DBPT) is one of the prescriptions used for the treatment of knee arthritis in oriental medicine. The present study aimed to examine the analgesic effect of DBPT on a rat model of carrageenan-induced arthritis, and the relations between DBPT-induced analgesia and endogenous nitric oxide(NO) and inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and c-Fos protein expression in the spinal cord.

**Methods :** Carrageenan-induced arthritis rat model was used to test the effect of DBPT as a chronic pain model. After the induction of arthritis, rats subsequently showed a reduced stepping force of the affected limb for at least the next 4 days. The reduced stepping force of the limb was presumably due to a painful knee, since oral injection of indomethacin produced temporary improvement of weight bearing. DBPT dissolved in normal saline was injected several acupoints. After the treatment, behavioral tests measuring stepping force were periodically conducted during the next 12 hours.

**Results :** DBPT produced significant improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis lasting at least 9 hours.

The magnitude of this improvement was equivalent to that obtained after an oral injection of 3 mg/kg of indomethacin and this improvement of stepping force was interpreted as an analgesic effect. DBPT produced the improvement of stepping force of the affected hindlimb in a dose-dependent manner. Both NO production and iNOS, COX-2 protein expression increased by arthritis were suppressed by DBPT. DBPT on combination with electroacupuncture (EA) produced more powerful and longer lasting improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis than either DBPT or EA did.

**Conclusion :** The present study suggest that DBPT produces a potent analgesic effect on the chronic knee arthritis pain model in the rat and that DBPT-induced analgesia modulate endogenous NO through the suppression of iNOS/COX-2 protein expression.

**Key words :** Daebangpungtang herbal acupuncture, carrageenan,arthritis

• 교신저자 : 김경식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

경혈학교실, Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458,

E-mail : meridian@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2005/02/30 · 수정 : 2005/09/16 · 채택 : 2005/09/20

## I. 서 론

관절염은 산업 문명이 발달하고 사회구조가 복잡해짐에 따라 스트레스가 많아지고 식생활 변화나 환경오염 등으로 인해 관절염 환자들은 계속 증가하는 추세이다. 특히 류마토이드 관절염(Rheumatoid arthritis)은 만성 관절염 중 퇴행성 관절질환 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환으로 초기에는 관절의 浮腫과 疼痛을 초래하며 대칭적 관절변형과 관절강직을 유발하여 전신적으로 증상을 일으킨다<sup>1,2)</sup>.

한의학에서 관절은 “諸筋者 皆屬於節”이라 하여 筋의 기능적 발현의 취합처이며 屈伸內外轉 및 回轉등을 담당하는 운동기관으로, 관절염은 다양한 원인으로 인하여 관절부위의 疼痛, 腫脹, 硬直, 發赤, 發熱, 運動障碍가 나타나는 질환이라 하였다<sup>3)</sup>. 이러한 관절염에 나타나는 염증을 억제하고 통증을 제거하기 위해 여러 가지 처방들을 이용하여 왔고, 임상에서는 체내에 광범위하게 또는 국소적으로 진통효과를 나타내기 위하여, 약물치료를 하면서 전침, 약침, 봉침 등과 같은 다양한 형태의 침치료를 병행하고 있다.

관절염을 치료하는 대표적인 처방으로 大防風湯, 大羌活湯, 獨活寄生湯, 牛膝湯 등을 들 수 있는데, 특히 大防風湯은 宋代 <太平惠民和劑局方><sup>4)</sup>에 수록된 처방으로, 不能屈伸, 兩膝腫大而痛한 증상과 脾脛이 마르는 鶴膝風<sup>5)</sup>, 氣血兩虛의 膝腫痛<sup>6)</sup>, 류마티스 관절염, 척수염, 산후혈관전색으로 인한 下肢不用<sup>6)</sup>등을 치료하는데 응용되고 있다.

약침요법은 기존의 침법과 한약을 결합하여 발전시킨 新針療法의 일종으로 한약제재를 경혈의 자극수단으로 사용하고 있다. 현재 한의학 임상에서 다양한 종류의 약침이 활용되고 있으며 그 치료의 유효성이나 효과 기전에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 이 연구에서는 만성

관절염 실험동물 모델에서 관절염에 쓰이는 대표적인 처방인 대방풍탕을 약침으로 투여하여 진통효과와 그와 관련된 기전을 알아보기 하였다. 아울러 약침의 특성을 알아보기 위하여 건축과 환축의 효과와 근위부와 원위부 경혈 약침 자극의 차이를 비교하였다.

이 연구에서 만성 관절염 모델은 carrageenan으로 유도한 실험모델을 사용하였는데,  $\lambda$ -carrageenan은 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 급, 만성 염증을 일으키는 특성<sup>7)</sup>이 있어서 관절염 실험 동물모델로서 많이 사용되고 있다.

이에 저자는 carrageenan으로 유도한 관절염 실험동물 모델을 사용하여 大防風湯 약침의 진통효과와 척수에서 과민성을 유발하는 iNOS, COX-2, c-Fos 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 sprague-dawley (6주령, 170-190 g) 가 사용되었으며, 원광대학교 한의학전문대학원에서 사육되었다. 동물은 온도  $22 \pm 1$  °C, 상대습도  $55 \pm 10$  %의 조건에서 12시간 주야로 주기를 바꿔주면서 한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

## 2) 약재

약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다. 처방은 방약합편에 준하였고 그 내용(1첩기준)은 Table 1과 같다.

## 3) 대방풍탕 추출물 조제

대방풍탕 총 5첩에 해당하는 190 g을 물 1810ml과 함께 환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 2시간동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 52 ℃에서 진공농축으로 감압농축시켜 -70 ℃에서 24시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결건조하여 21.35g의 분말시료를 얻었다.

Table 1. 대방풍탕의 처방구성  
(Prescription of DaeBangPungTang)

한약명	생 약 명	용량
熟地黃	Rhizoma Rehmanniae	6g
防 風	Radix Ledebouriellae	4g
當 歸	Radix Angelicae Gigantis	4g
白芍藥	Radix Paeoniae Lactiflorae	4g
杜 冲	Cortex Eucommiae	4g
黃 茜	Radix Astragali	4g
附 子	Radix Aconiti	2g
川 莖	Rhizoma Cnidii	2g
牛 膝	Radix Achyranthis	2g
羌 活	Radix Osterici Koreani	2g
人 參	Radix Ginseng	2g
甘 草	Radix Glycyrrhizae	2g
총 량		38g

## 4) 약침

대방風湯 추출물을 생리식염수에 100 mg/ml 또는 10 mg/ml의 농도 용해시킨 후 pH를 6.5

로 맞추어 사용하였다. 약침 주입은 인슐린 주사기(0.5 cc, 29 gauge 1/2")를 사용하여 건측, 환측 頤鼻와 환측 下巨虛에 200  $\mu$ l 씩 약침 주입하였다.

## 5) 전침

직경 0.25 mm, stainless-steel 재질의 한 쌍의 침을 건측 족삼리(ST36)에 삽입하였다. 동물에서 자침은 사람의 경혈 자리에 상응하는 부위에 자침하였다. 침은 pulse generator(stimulator)에 연결되어 1 ms duration, 4 pulse의 train (1 ms의 정사각파, 100 Hz의 intra-train frequency)이 출력되었다. 실험하는 동안 사각파의 주파수(frequencies)는 2 Hz가 쓰였으며, 강도(intensity)는 2 mA(muscle twitch threshold의 10배정도의 강도로써, muscle twitch threshold는 보통 200  $\mu$ A 근방이다)의 자극강도를 사용하였다. 양극(+,-)은 전극의 분극(polarization)을 막기 위해 1분마다 역전되었다. 전침 처치가 끝난 즉시 마취는 중단되었으며 5~10분 내에 동물은 완전히 깨어나 정상적으로 활동하기 시작하였다. 총 자극시간은 30분으로 하였다. 관절염모델에서 weight bearing force는 전기적 자극 후 3시간, 6시간, 9시간, 12시간에 측정하였다.

## 6) 약물

대방風湯 약침의 진통효과 강도를 비교하기 위하여, indomethacin을 투여하였는데, indomethacin(Sigma, St. Louis, MO)은 물에 용해시켜 1 mg/kg, 3 mg/kg의 농도로 구강으로 투여하였다.

## 2. 재료

### 1) 관절염 유도

관절염은 enflurane(Ilsung pharmaceuticals,

Soeul, Korea)과 O<sub>2</sub>로 혼합된 마취상태에서 생리식염수에 녹인 2 %  $\lambda$ -carrageenan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50  $\mu$ l를 주입하여 유발시켰다. 주입 후 마취를 중단하였으며, 수술 받은 쥐들은 무도 5~10분내에 마취에서 회복되었다.

## 2) 동물행동 검사

통증 정도를 측정하기 위해서 관절염이 유발된 후의 바닥을 딛는 힘을 측정하였다. 동물을 투명한 아크릴로 만든 긴 통로(폭 10 cm, 높이 10 cm, 길이 60 cm)를 자유스럽게 걷게 하고, 통로 바닥의 절반에 전자저울(accumab, pocket pro 250-B, Newton, PA, USA)을 설치하여 한쪽 발이 디디는 압력만을 측정하였다. 전자저울에서 나오는 전기신호는 압력의 변화를 전압의 변화로 보여주는데 이를 CED(1401 plus)에 연결하여 spike 2 프로그램(cambridge electronic design Ltd, UK version 4.12)으로 전압의 변화를 관찰하였다. 발이 딛는 압력(Weight Bearing Force; WBF)은 총 회복률(full recovery rate; FRR)로 변환하여 측정값으로 사용하였는데 이는 다음과 같은 공식으로 구하였다.

$$FRR(\%) = (\text{大防風湯 투여 후 증가한 WBF}/\text{관절염으로 감소한 WBF}) \times 100$$

관절염 모델 동물의 WBF가 시간 경과에 따른 변화를 측정하기 위하여 관절염 유발 후 일정한 시간마다 측정하였다. 모든 행동검사는 각 측정 시간마다 3회 실시하여 평균값을 취하여 측정값을 얻었으며 행동검사는 맹검법으로 시행하였다.

## 3) 단백질의 분리 및 정제

척수에서 c-Fos, COX-2, iNOS 단백질 발현을 측정하기 위하여 대조군, carrageenan 유발

성 관절염 실험군 및 관절염에 大防風湯을 투여한 실험군의 동물들을 chloralhydrate 250 mg/kg으로 마취하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 심장관류하여 혈액을 제거한 후 재빨리 척수를 박리하였다. 박리된 척수는 dry-ice powder에 신선하게 얼려 사용할 때 까지 -80°C에 보관하여 놓았다. 보관된 척수에 homogenization buffer 3 ml을 가하여 homogenizer로 3회(15초 같고 10초 쉬는 행위를 3회 반복) 균질화시킨 후, 3,000 ×g로 10분 동안 원심 분리시켰다. 상층액을 분리하여 eppendorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80°C에 저장하여 놓았다. 이 시료는 COX-2, iNOS 단백질을 분석하기 위해 사용되었다. 이 시료를 4°C에서 13,000 ×g로 10분 동안 2회 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 eppendorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80°C에 저장하여 놓았다. 이 시료는 c-Fos 단백질을 분석하기 위해서 사용되었다.

## 4) 산화질소 정량

척수조직내 산화질소(NO) 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 안정된 마지막 산물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>에 대해서 분석하였다.

간단히 기술하면, 각 샘플 40  $\mu$ l와 MOPS buffer(50 mM MOPS/1 mM EDTA, pH 7.0) 45  $\mu$ l를 혼합하고 reconstituted Escherichia coli nitrate reductase(500  $\mu$ l MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5  $\mu$ l를 가한 후 2 mM NADH 10  $\mu$ l를 가하여 20분동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 50  $\mu$ l Griess reagent A(1% sulfanilamide in 3N HCl)와 짧게 반응시키고, 50  $\mu$ l Griess reagent B(0.1 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2HCl)와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, purple azo dye가 생성되면 30분 이내에 Microtiter plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡수율을 측정하였다. Ni-

## 大防風湯 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

trite 농도의 표준곡선은  $\text{NaNO}_3$ 로부터 계산되었다.

### 5) Western blot 분석

단백질 blotting을 위하여 보관하여 놓은 단백질 시료를 5배 농축된 SDS sample buffer(1× 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % glycerol, 0.003 % bromophenol, 1 %  $\beta$ -mercaptoethanol)와 섞어서 98°C에서 5분간 끓인 후 10,000 rpm에서 5~10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel에 걸어서 electrophoresis를 한다. 그리고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer시킨다. Membrane은 실온에서 blocking buffer(TBS-T에 5 % skim milk, 10 % NaH3를 포함)에 blocking을 하고, anti-iNOS, anti-COX-2, anti-c-Fos antibody를 1:1,000으로 하여 1시간 동안 반응시킨 후 4 °C에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase-conjugated secondary

antibody(Anti-rabbit IgG)와 2시간 동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 실온에서 NBT/BCIP solution (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 5분 동안 반응시켜 발색하였다.

### 6) 통계분석

데이터는 Mean± SEM으로 나타내었다. 통계검사는 Dunnett's post-hoc test에 의한 one way repeated measure analysis of variance (ANOVA)로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## III. 결 과

### 1. WBF의 변화

관절염 모델에서 딛는 압력(weight bearing force; WBF)의 변화를 측정하였다. 관절염을 유발하기 전에 건강한 흰쥐에서 뒷발에 대한 WBF를 측정한 결과 정상 상태에서는 몸무게의 55 %~ 60 % 가량의 힘이 가해지는 것을 관찰할 수 있었다. 무릎 관절에 염증을 유발하면 통증으로 인하여 딛는 압력이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 생리식염수와 2 % Carrageenan 50  $\mu\text{l}$ 를 오른쪽 관절강에 주입한 결과 Fig. 1.에서 볼 수 있는 것처럼 생리식염수를 주입한 동물은 딛는 압력의 변화가 거의 없었지만, Carrageenan을 주입한 동물에서는 주입한 후 4시간 후부터 현저하게 WBF가 감소하기 시작하여 6시간 후에 최대로 감소하였다. 이러한 통증 행동은 시간이 지나면서 차츰 회복 되었는데 약 4일 정도 통증이 유지되었다 (Fig. 1.).

Carrageenan으로 유도한 관절염 모델에서 실험동물은 무릎 관절강 내의 염증으로 인한 통증을 느끼기 때문에 염증이 유도 된 쪽 발로 딛는

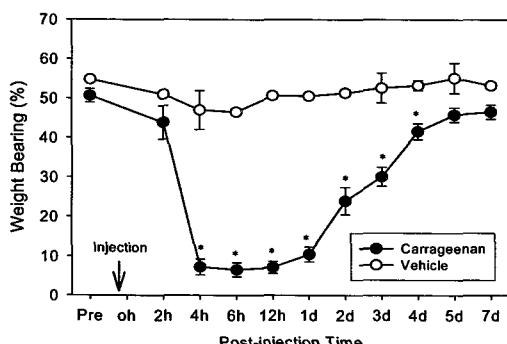


Fig. 1. Time course of carrageenan-induced arthritis model. Post-injection time is expressed as hours(h) and days(d) after Carrageenan injection. Pre-injection control was taken one day before the injection (Pre). Asterisks indicate values significantly different from the pre-injection control value by one-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test ( $n=10$ )

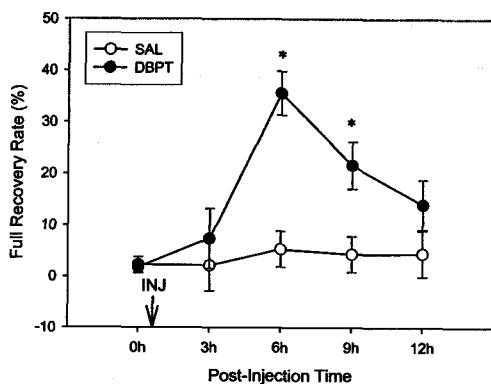


Fig 2. Effect of DBPT on foot stepping force in a Carrageenan-induced arthritic rats.

All animals were subjected to the injection of carrageenan into the knee joint on the right side of rats and showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis as evidenced by a dramatic lowering of foot stepping force when compared to the preoperative value. DBPT (100mg/ml, 200  $\mu$ l) or normal saline (SAL) was injected to ipsilateral ST<sub>35</sub> point of the rats (n=8). After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 3h, 6h, 9h, 12h. DBPT showed a significant improvement of stepping force of the limb at 6h and 9h after DBPT injection. Asterisks indicate the values that are significantly different from the pre-treatment baseline value ( $p<0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

압력을 줄여서 통증을 덜 느끼기 위한 행동을 하는 것으로 생각하여 본 연구에서는 이러한 행동양상을 이용하여 줄어든 압력을 통증에 대한 척도로 삼았다.

## 2. 대방풍탕 약침의 진통효과

Carrageenan의 슬관절강내 주입에 의해 유발

된 관절염 모델에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 대방풍탕의 진통 효과를 알아보았다. 모든 동물은 Carrageenan의 주입으로 관절 염이 유도된 후 동측 하지의 weight bearing이 현저하게 감소되었다. 실험군은 환측 독비혈에 대방풍탕 약침을 100 mg/ml의 농도로 200  $\mu$ l를 주입하였으며, 대조군은 생리식염수를 환측 독비혈에 같은 부피를 주입하였다. 약침 투여 후, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간째에 동물 행동 테스트를 실시하였다. 대방풍탕 약침군은 주입 후 6시간, 9시간에 약침주사하기 전 값에 비해 WBF가 유의하게 개선되었다. 대조군은 실험하는 12시간동안 유의한 변화를 나타내지 않았다. 실험군은 6시간째 stepping force의 변화가 가장 높았으며, 시간이 지남에 따라 점차 감소하기 시작하였으며, 대방풍탕의 진통효과는 적어도 9시간정도 유지되었다

## 3. 인도메타신의 진통효과

대방풍탕의 진통효과의 강도를 비교하기 위하여 관절염 모델에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 인도메타신의 효과를 조사하였다. 실험군은 인도메타신 1 mg/kg 및 3 mg/kg 을 구강으로 투여하였으며, 대조군은 구강으로 물을 주입하였다. 치치 후, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간째에 동물행동 검사를 실시하였다.

인도메타신 1 mg/kg이 투여된 실험군은 투여 후 1시간(FRR; 25.52±3.148%)에 손상 받은 동측 하지의 WBR가 유의하게 개선되었다. 인도메타신 3 mg/kg이 투여된 실험군은 투여 후 1시간 (FRR; 33.75±2.83 %), 2시간(FRR; 28.98±3.40 %), 3시간(FRR; 19±5.21 %)에 손상 받은 동측 하지의 WBR가 유의하게 개선되었다. 대조군은 실험하는 4시간동안 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 두 실험군 모두 투여 후 1시간에 딜

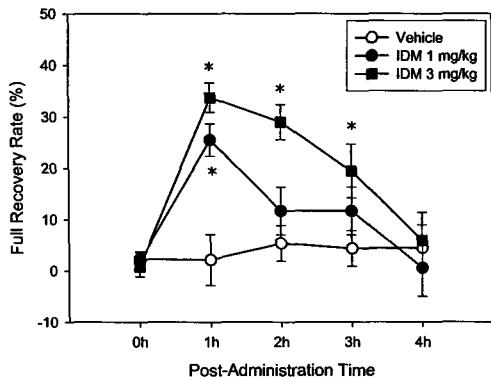


Fig. 3. Effect of Indomethacin on weight bearing force in carrageenan-induced arthritis. All animals were subjected to the injection of carrageenan into the knee joint on the right side of rats and showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis from 1 day after the induction of arthritis as evidenced by a dramatic lowering of foot stepping force when compared to the preoperative value. Indomethacin 1 mg/kg and 3 mg/kg were orally administrated. After the termination of injection, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 1h, 2h, 3h, 4h. Control group orally administrated only water ( $n=8$ ). Indomethacin 1mg/kg and 3 mg/kg showed a significant improvement of stepping force of the limb affected by arthritis. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p<0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

는 압력의 변화가 가장 컸으며, 그 후 시간이 지날수록 WBF가 점차 감소하는 경향을 보였다 (Fig.3).

대방풍탕의 진통효과와 비교하여 보았을 때, 대방풍탕 100 mg/ml, 200 $\mu$ l 주입이 인도메타신 3 mg/kg과 비슷한 진통효과를 나타냄을 알 수 있었다.

#### 4. 대방풍탕의 농도에 따른 진통효과

대방풍탕의 농도에 따른 진통효과를 알아보기 위하여 carrageenan을 슬관절강내 주입에 의해 유발된 관절염 모델에서 농도별 대방풍탕 약침 투여가 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 모든 동물은 carrageenan 주입으로 관절염이 유도된 후 동측 하지의 weight bearing이 현저하게 감소되었다. 관절염을 유발시킨 다음날, 실험군은 10 mg/ml, 100 mg/ml 농도의 대방풍탕을 200  $\mu$ l씩 患側 獺鼻에 약침 주사하였고, 대조군은 생리식염수 200  $\mu$ l를 患側 獺鼻에 주사하였다. 치치 후 3시간, 6시간, 9시간, 12시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

생리식염수를 주사한 동물은 감소된 WBF의 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 대방풍탕을 10 mg/ml을 투여한 실험군에서는 약침 주입 후 서서히 weight bearing이 증가하는 경향이 있었으며, 9시간째에 유의한 증가를 보였다(FRR;16.61  $\pm$  8.51%). 이에 비해, 대방풍탕 100 mg/ml를 투여한 군에서는 6시간후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR;35.61  $\pm$  4.27%) 이러한 효과는 9시간(FRR;21.61  $\pm$  4.57%)까지 지속되었다.

#### 5. 침, 대방풍탕 및 침과 대방풍탕의 결합 치료의 진통효과

전침과 대방풍탕을 각각 단독으로 또는 결합하여 치치하였을 때 관절염에 의해 감소된 weight bearing에 대해 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 carrageenan으로 관절염을 유발하고 건측 足三里에 전침자극을 하고 환측에 대방풍탕 약침을 주어서 효과를 비교하였다. 실험군은 전침군, 대방풍탕군, 전침과 대방풍탕 결합군으로 나누어 실험하였다. 전침군은 관절염

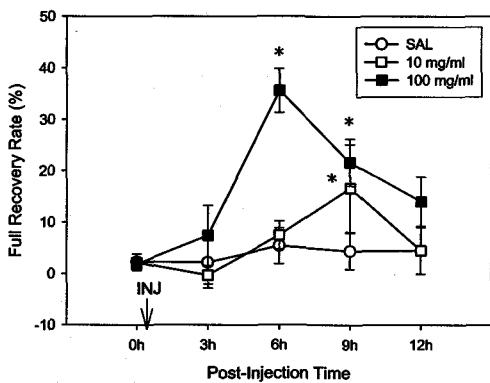


Fig. 4. Dose dependent effect of DBPT injection on carrageenan-induced arthritis.

Two doses of DBPT (10 mg/ml, 100 mg/ml) or normal saline (SAL) was injected to rats. After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 0h, 3h, 6h, 9h, 12h. In 8 rats with arthritis, water only and two doses of DBPT dissolved in saline were applied after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner. Asterisks indicate values significantly ( $p<0.05$ ) different from the pre-treatment baseline value by one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test.

이 유도된 동물의 건축하지의 足三里에 마취상태에서 30분간 전침 자극을 하였다. 결합치료군은 전침군과 같이 足三里에 전침을 자극하고 자극이 끝난 5분후에 대방풍탕을 환측 獔鼻에 약침을 주사하였다. 대방풍탕군은 전침자극이 끝나는 시간에 투여하였다.

건축 족삼리 전침자극군은 감소한 weight bearing이 전침 자극 후 3시간에서 6시간까지 유의하게 증가하였으며, 대방풍탕 약침군은 weight bearing이 6시간 후부터 증가하기 시작하여 9시간까지 지속되었다. 이에 반해 대방풍

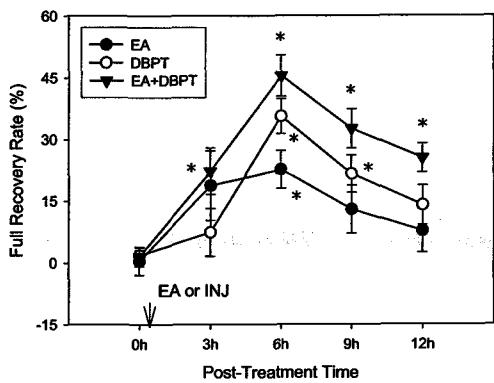


Fig. 5. Effect of EA, DBPT, and co-treatment of EA and DBPT on carrageenan-induced arthritis.

Eight rats were divided into 3 groups on random order. One group applied EA to the ST<sub>35</sub> acupoint of contralateral hindlimb. In the other group, DBPT (100 mg/ml, 200 $\mu$ l) was injected ipsilateral ST<sub>35</sub>. In the third group, DBPT was injected after EA stimulation. WBF was measured at 0h, 3h, 6h, 9h and 12h after the treatment. Each experiment was applied for 3 days after the induction of arthritis in a single-blind manner. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p<0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

탕과 전침 결합처치군은 관절염에 의해 감소된 weight bearing을 더욱 강력하게 개선시켰으며, 그 효과는 12시간 후까지 지속되었다(Fig.5.).

## 6. 건축과 환측 약침 효과 비교

건축과 환측 약침 효과를 비교하기 위하여 대방풍탕을 健側 獔鼻와 患側 獔鼻에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 다음날, 100 mg/ml 농도의 대방풍탕을 200  $\mu$ l 씩 患側과 健側 獔鼻에 약침 주사하였고, 처치 후 3시간, 6시간, 9시간,

12시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

건측 독비에 약침 주사한 동물은 약침 주입 후 3시간(FRR;15.86±1.70 %), 6시간(FRR;18.67±2.67 %)에 유의하게 weight bearing이 증가하였으며, 이에 비해, 환측 독비에 약침 주사한 동물은 6시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR;35.61±4.27%) 이러한 효과는 9시간(FRR;21.61±4.57%)까지 지속되었다(Fig.6).

## 7. 환부 주위혈과 원위부혈의 효과 비교

환부 주위혈 약침의 효과와 원위부혈의 약침 효과를 비교하기 위하여 대방풍탕을 患側 獢

鼻와 下巨虛에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 다음날, 100 mg/ml 농도의 대방풍탕을 200  $\mu$ l 씩 患側 獢鼻와 下巨虛에 약침 주사하였고, 처치 후 3시간, 6시간, 9시간, 12시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

患側 下巨虛에 약침 주사한 동물은 검사를 실시한 전 시간에 걸쳐서 유의한 weight bearing 증가를 관찰할 수 없었다. 이에 비해, 환측 독비에 약침 주사한 동물은 6시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR;35.61±4.27%) 이러한 효과는 9시간(FRR;21.61±4.57%

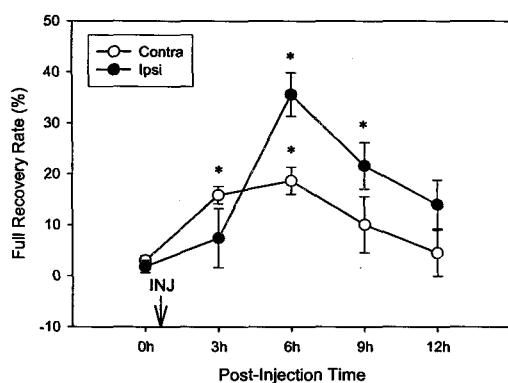


Fig. 6. Effect of DBPT injected into unilateral ST<sub>35</sub> on carrageenan-induced arthritis. Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, DBPT(100 mg/ml, 200  $\mu$ l) was injected to contralateral ST<sub>35</sub> acupoint of knee joint. In the other group, same concentration and volume of DBPT was injected ipsilateral ST<sub>35</sub>. WBF was measured at 0h, 3h, 6h, 9h and 12h after the treatment. Each experiment was applied for 2 days after the induction of arthritis in a single-blind manner. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value( $p<0.05$  by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

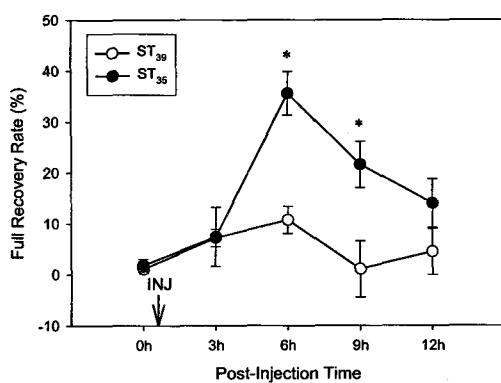


Fig. 7. Effect of DBPT injected into ST<sub>35</sub> or ST<sub>39</sub> on carrageenan-induced arthritis. Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, DBPT(100 mg/ml, 200  $\mu$ l) was injected to ipsilateral ST<sub>39</sub> acupoint of hind limb. In the other group, same concentration and volume of DBPT was injected ipsilateral ST<sub>35</sub>. WBF was measured at 0h, 3h, 6h, 9h and 12h after the treatment. Each experiment was applied for 2 days after the induction of arthritis in a single-blind manner. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value( $p<0.05$  by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

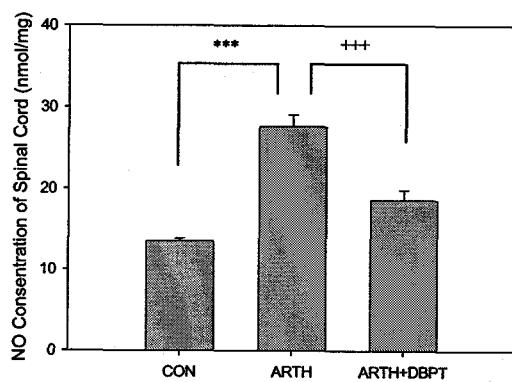


Fig. 8. Effect of DBPT on the nitrite/nitrate levels of spinal cord in the different experiment groups. NO production on the spinal cord was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. Arthritis group was not performed any other treatment except for water administration. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*\*\* p<0.01, compared with the untreated control group. +++ p<0.01, compared with the arthritis group.

%)까지 지속되었다(Fig.7).

## 8. 척수에서 NO 분석

술관절강내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 100 mg/ml 농도의 大防風湯을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 대방풍탕 약침이 척수에서 NO에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 대방풍탕 약침 주입을 하고 6시간 후에 척수 조직을 적출하여 NO를 분석하였다. Fig. 8에 보이는 것처럼 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대방풍탕을 처치한 동물들의 척수에서 NO를 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물(13.49 $\pm$ 0.36 nmol/mg)에 비해 NO의 생산이 유의하게 증가하였으며(27.62 $\pm$ 1.42 nmol/mg), 대방풍탕을

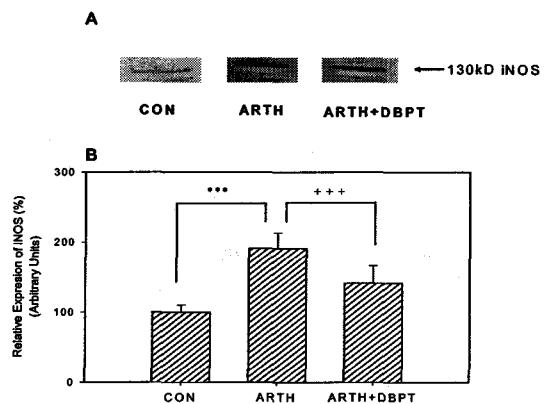


Fig. 9. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of iNOS expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to that of iNOS. The iNOS signal was enhanced in the sample from the carrageenan-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from DBPT-treated arthritis group when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*\*\* p<0.01, compared with the untreated control group. +++ p<0.01 compared with the arthritis group.

처치한 술관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 NO가 감소하였다(18.57 $\pm$ 1.25 nmol/mg).

## 9. 척수에서 iNOS 단백질에 대한 Western blot 분석

술관절강내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 100 mg/ml 농도의 大防風湯을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 대방풍탕 약침이 척수에서 iNOS 발현에 미

## 大防風湯 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

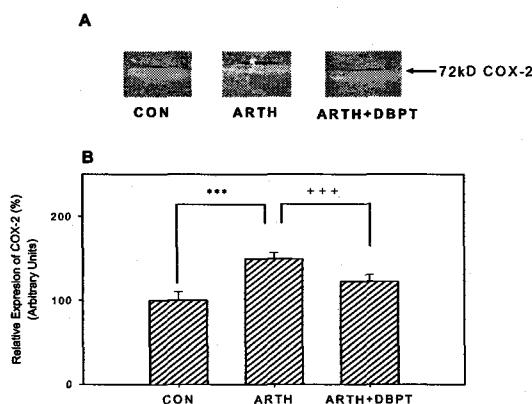


Fig. 10. Effect of DBPT on the COX-2 expression in the spinal cord.

Western blot (A) and densitometric (B) analysis of COX-2 expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The COX-2 signal was enhanced in the sample from the carrageenan-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from DBPT-treated arthritis group when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*\*\* p<0.001, compared with the untreated control group. ++ p<0.001 compared with the arthritis group.

치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 대방풍탕 약침 주입을 하고 6시간 후에 척수 조직을 적출하여 iNOS를 분석하였다. 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대방풍탕을 처치한 동물들의 척수에서 iNOS를 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 iNOS의 발현이 유의하게 증가하였으며(191.21 $\pm$ 22.33 %), 대방풍탕을 처치한 슬관절 염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 iNOS

의 발현이 감소하였다(141.45 $\pm$ 24.90 %). (Fig.9)

## 10. 척수에서 COX-2 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 100 mg/ml 농도의 大防風湯을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 대방풍탕 약침이 척수에서 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 대방풍탕 약침 주입을 하고 6시간 후에 척수 조직을 적출하여 COX-2 발현을 분석하였다. 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대방풍탕을 처치한 동물들의 척수에서 COX-2 발현을 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 COX-2의 발현이 유의하게 증가하였으며(149.23 $\pm$ 7.30 %), 대방풍탕을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 COX-2의 발현이 감소하였다(122.39 $\pm$ 8.05 %). (Fig.10)

## 11. 척수에서 c-Fos 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 2 % carrageenan 50  $\mu$ l를 주입하여 관절염을 유발시킨 후 100 mg/ml 농도의 大防風湯을 환측 독비에 200  $\mu$ l를 약침 자극을 주어 대방풍탕 약침이 척수에서 c-Fos 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 관절염을 유발시킨 후 대방풍탕 약침 주입을 하고 6시간 후에 척수 조직을 적출하여 c-Fos 발현을 분석하였다. 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대방풍탕을 처치한 동물들의 척수에서 c-Fos 발현을 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 c-Fos의 발현이 유의하게 증가하였으며(123.13 $\pm$ 4.48 %), 대방풍탕을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해

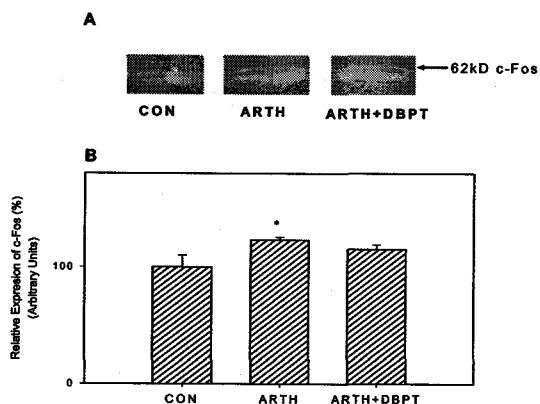


Fig. 11. Effect of DBPT on the c-Fos expression in the spinal cord.

Representative Western blot (A) and densitometric analysis (B) of c-Fos in the spinal cord in rats with control (CON), carrageenan-induced arthritis (ARTH), and DBPT treatment with arthritis (ARTH+DBPT). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Each data represents mean $\pm$ SEM of 5 experiments. \*  $p<0.05$ , compared with control.

c-Fos의 발현이 감소하는 경향( $115.27\pm3.88\%$ )은 보였으나 통계적 유의성은 없었다. (Fig.11)

#### IV. 고 칠

류마티스관절염은 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증을 야기하여 pannus에 의한 뼈의 파괴, 각종 cytokine에 의한 윤활 관절막염, 다양한 단백분해효소, O<sub>2</sub> radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화 등으로 인하여 연골의 소실<sup>8)</sup>과 관절의 변형을 가져오는 원인불명의 만성 전신성 다발성 질환이다<sup>9)</sup>. 특히 심한 경우 류마티스성 결정, 맥관염, 안염증, 신경기능이상, 심폐기능장애, 림프절병증, 비장종대등의 증상이 발생된다.

류마티스 관절염의 발병원인은 아직 불확실하나, 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알

려져 있다. 즉, 윤활액내의 type II collagen 역증가<sup>10)</sup>, collagenase의 증가<sup>11)</sup>, prostagladins E2 증가<sup>12)</sup>, stromelysin 및 plasminogen activator 증가<sup>13)</sup> 등이 보고되었다.

관절염은 임상에서 흔히 접하는 질환중의 하나로 심한 통증과 장애를 초래한다. 그 병태생리를 규명하고, 효과적인 치료방법을 알아내기 위하여 많은 연구가 되어왔으나 아직까지 원인이 분명하게 밝혀지지 않았다. 미국에서는 전체 성인의 약 1/3 정도가 부종, 통증, 제한된 관절운동 범위 등의 관절염 증상이나 징후를 보이면, 관절염이 50세 이상 성인의 주된 건강문제라고 보고되었다<sup>14)</sup>.

관절염은 지속적인 통증을 동반하여, 일상생활 수행에 불편함을 초래하고, 사고에 대한 가능성을 증가시킨다. 또한 관절염 환자들이 경험하는 가장 고통스러운 증상인 통증은 관절염 환자의 일상생활 및 삶의 질에 영향을 미치는 가장 중요한 증상으로 보고되고 있다<sup>15)</sup>.

관절염과 같은 염증이나 외상시 어떤 통증의 원인이 지각신경밀단을 자극하여 흥분하며, 이것이 척수를 통하여 뇌로 전달되어 통증으로 지각된다. 지각된 통증에 의해 운동신경 및 교감신경이 흥분되어 통증이 발생한 부위를 중심으로 근육긴장과 혈관수축이 일어나고 이로인해 통증부위에 혈류를 저하시키므로서, 통증유발물질이 생성되고, 이 물질이 장기간 머물게 되어 통증이 지속된다.

만성 염증 질환의 하나인 류마티스성 관절염은 윤활 조직과 윤활액으로의 면역계 세포 침윤, 윤활액에서의 섬유모세포 증식 및 관절 연골과 연골하 조직에 침윤하여 파괴하는 판누수(pannus) 조직의 형성 등을 그 특징으로 하고 있다. 그 병인은 아직 확실하게 밝혀진 바 없지만, 염증 반응이 기본이 되는 여러 세포나 분자 수준

의 기전과 관절 연골과 연골하 조직의 세포의 메트릭스(extracellular matrix)의 분해와 관련이 있다는 것이 점점 더 명확해지고 있다.

류마티스성 관절염은 퇴행성관절염과는 매우 다른 질병이다. 즉, 퇴행성관절염은 연골조직의 마모로서 생기는 질환인 반면에 류마티스성 관절염은 염증성 세포의 작용에 의한 자가면역 질환의 일종이다. 즉, 백혈구가 과잉으로 생성되어 관절에 상해를 주는 질환이다. 일반적으로 류마티스성 관절염은 퇴행성관절염에 비하여 급격히 일어나고 관절이 변형되어 기능에 장해가 생기게 되며, 통증이 심하여 경우에 따라서는 관절을 교체해야 하는 경우도 생기게 된다.

관절염은 현재까지 그 원인이나 치료법이 명확히 확인된 바가 없기 때문에 관절염 유발 시 혈중에서 증가하게 되는 각종 단백질 분해 효소나 공격적인 성격을 갖는 싸이토카인 등의 조절제 혹은 관절염에 의해 생기는 통증을 억제하는 진통제 등이 그 치료제로 이용되고 있는 실정이지만, 골수억제, 고혈압, 간장 및 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용을 유발하여 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

한의학에서 류마티스관절염은 歷節風의 범주에 속하는 것으로, 白虎歷節風, 鶴膝風, 痛風, 痛痺, 痘證, 風痺, 白虎風, 走注疼痛등의 異名을 가지며 膝, 足, 肘, 腕, 手足關節 등에 극렬한 疼痛과 紅腫, 변형을 일으킬 수 있는 流走性 疼痛疾患이다<sup>16)</sup>. 歷節風의 원인에 대하여 張<sup>17)</sup>이 疲勞, 汗出後風邪所致라 한 以後로 巢<sup>18)</sup>는 “飲酒腠理開, 汗出當風所致也... 亦有氣血虛”라 하였으며, 以後 醫家들은 風寒濕邪의 感觸과 氣血虛弱, 肝腎虛<sup>19)</sup> 등을 주된 원인으로 들고 있다.

고대 문헌을 인용하면 관절염은 주로 痘證의 범주에 속한다<sup>20)</sup>. 痘證은 <黃帝內經>에 최초로

나타나는데, <素問 痘痛編>에 “風寒濕 三氣가 혼합되어 痘證이 되는데, 風氣가 勝할 때는 行痺가 되고, 寒氣가 勝할 때는 痛痺가 되고, 濕氣가 勝할 때는 着痺가 된다.”, “소위 痘라는 것은 風寒濕邪에 重感되어 발생한다.”, “飲食居處가 痘의 근본이 된다.”라고 하였다. 後代에는 痘證이 濕生熱, 혹은 風寒鬱熱로 인하여 身上如鼠走, 脣口反縱, 肌肉變色하게 된다 하였다.

痺證의 치료원칙으로서 宣通이 共通治法이 되고, 風寒濕熱의 邪氣에 대하여 각각 祛風, 散寒, 除濕, 清熱藥物을 적절히 배합하여 다스리는데, 痘證이 오래되어 瘀血과 痰濁이 생겨난 경우에는 活血藥物, 祛瘀藥物 및 搜風祛邪藥物을 함께 사용한다. 평소 체질이 허약하거나 혹은 久病으로 허약해진 경우에는 調補氣血, 補腎壯陽, 滋陰養肝하는 약물들을 응용하는데<sup>21)</sup>, 대표적인 처방이 大防風湯이다.

大防風湯은 宋代 <太平惠民和劑局方><sup>4)</sup>에 수록된 처방으로 많은 醫家들에 의해 임상에 활용되었는데<sup>18,19)</sup>, 용량은 醫家에 따라 다소 다르나 약물구성은 거의 동일하다. 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃으로써 補血하고, 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草로써 補氣하고, 羌活, 防風으로써 散風濕, 利關節하며, 牛膝, 杜仲으로써 補腰膝하고, 附子로써 人蔘, 黃芪의 기운을 전신맥락에 行하게 하여 氣血兩虛에 風濕을 겸하여 나타난 瘦痺不能行의 聖藥이 된다.

실제로 가장 많이 쓰여지는 임상서적중의 하나인 方藥合編<sup>22)</sup>에서 “대방풍탕은 鶴膝風을 치료하며 祛風, 順氣, 活血, 壯筋하며 만성관절류마티스, 脚氣, 筋肉麻痺, 膝眼痛, 脊髓疾患, 半身不隨, 貧血, 產後脚氣, 小兒麻痺, 下肢無力등에 응용한다.”라 하였고, 東醫寶鑑<sup>23)</sup>에서는 “痺疾을 앓은 뒤에 다리가 아프며 마비되고 약해져서 잘 걷지 못하는 것을 痘風이라고 한다. 양 무릎

이 붓고 뭉시 아프며 넓적다리와 정강이가 여위어 피부와 뼈만 남아서 학의 다리 마디처럼 되고 가드라들었기 때문에 누워서도 구부렸다 뻗다 하지 못하는 데는 대방풍탕을 쓴다” 라 하여 대표적인 관절염치료제로 설명하였다.

대방풍탕에 대한 최근의 연구결과로서 田<sup>24)</sup>의 보고에 의하면 대방풍탕은 혈관신생, 세포유착 인자의 발현 및 윤활세포의 과형성을 억제하였고, 그 결과 염증관련 면역연쇄의 차단, 섬유화 섬유모세포의 침착 비만세포 염증관여세포의 이주감소 등을 통해 관절염을 완화시키는 작용을 있다고 하였다. 또 崔<sup>25)</sup>의 보고에 의하면 대방풍탕에 의한 정상 흰쥐의 조직학적 변화는 미비하나, 관절염유발군에서 일부 PAS반응을 보이는 조직학적 변화를 보인다고 보고하여 관절염치료의 가능성을 열어 두었다.

해조류의 일종인 *Chondrus crispus*에서 추출한 고분자 물질인 carrageenan이 염증반응을 일으킨다는 사실이 Robertson 등에 의해 보고된 이래 급성 및 만성염증을 일으키는 실험적 모델로 carrageenan이 널리 이용되고 있다. carrageenan은 소량 단회주입만으로도 전신적인 부작용 없이 주입된 관절에서만 염증성 관절염을 일으킨다고 알려져 있다. carrageenan이 대식세포에 선택적인 독성작용이 있음은 이미 알려진 사실이며, 이는 대식세포의 분해소체막을 파열시켜 분해효소를 유리시키기 때문에 지속적인 염증반응이 나타나게 된다고 하며, 이때의 염증반응은 인간의 염증성 관절염에서 관찰되는 양상과 비슷하다고 한다.

이 연구는 Carrageenan의 관절강내 주입에 의해 발생된 만성관절염 동물모델에서 대방풍탕의 진통작용과 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos가 어떤 관계가 있는지 밝히고자 하였다.

Carrageenan에 의해 만성관절염이 유도된 후 척수에서 iNOS 단백질 발현이 증가되어 NO 생산이 증가되며, 이러한 NO는 만성관절염 모델에서 발생하는 hyperalgesia에 매우 중요한 역할을 하고 있다<sup>26)</sup>. NO는 1980년대부터 중추신경계의 전령물질로서 인식되어 왔다<sup>27)</sup> NO의 활성은 NOS라는 중요한 합성단백질에 의존한다. CNS의 통증 발생과정에서의 역할을 포함하여 NO에 대한 많은 기능들이 증명되어져 왔다.

iNOS외에도 nNOS는 염증이 발생하면 활성 및 발현이 모두 증가한다. Carrageenan을 한쪽 발바닥에 주입한 후 요추의 척수 양측 배각에서 감소된 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase에 대해 조직화학적 염색을 한 결과 NADPH-diaphorase가 증가되어 있었는데, 이는 염증의 급성기에 이 효소의 활성이 증가된다는 것을 가리킨다. 염증의 급성기에 NO가 증가되었다는 것은 arginine의 이용이 증가되었다는 것뿐만 아니라 NOS의 활성과 발현, 및 NADPH-diaphorase의 활성이 증가되었다는 가리킨다. 발바닥내 formalin을 주입하여 발생한 hyperalgesia에서 nNOS의 역할이 보고되었다<sup>28)</sup>. 만성관절염에서 NADPH-diaphorase의 활성이 증가되어 NO가 더욱 빠르게 증가될 수 있지만, nNOS이 발현이 증가되려면 염증이 유도된 후 적어도 6시간이 지나야만 한다<sup>29)</sup>.

Carrageenan에 의해 관절염이 유도되면 국소 염증이 발생하고 Nociceptor의 free nerve ending이 활성화된다. 염증이 시작된 후에는 발적, 부종, 발열감과 같은 국소 염증반응이 발생할 뿐만 아니라, C-fiber에서 높은 진동수의 신경방전이 생긴다. 이러한 높은 진동수의 신경방전은 구심성 신경섬유의 중추종말로부터 glutamate와 neurokinin들을 방출시킨다<sup>30)</sup>. 더 자세히 살펴보면, CNS에서 NO는 NMDA 수용체와 밀접한 관

## 大防風湯 藥鍼이 Carrageenan으로 유도한 관절염에 미치는 影響

계에 있다. 내인성 Glutamate에 의해 N-methyl D-aspartate(NMDA) 수용체가 활성화되면 중추신경세포내로 칼슘이 유입되어 nNOS를 활성화시키고 NO가 방출되게 되는데, NO는 또한 cGMP를 증가시켜 guanylyl cyclase를 활성화시킨다. 비NMDA 수용체 및 NK-1과 CGRP 수용체와 같은 펩타이드 수용체의 작용에 의해 흥분성 시냅스 전위가 발생하면 NMDA 수용체를 차단하고 있는 전압 의존성  $Mg^{2+}$ 이 제거된다. 그러면 NMDA 수용체가 활성화되고  $Ca^{2+}$ 이 NMDA 수용체의 이온통로를 통해 세포내로 유입하게 된다. 많은 논문들에서 보여지는 바와 같이, nNOS는  $Ca^{2+}$ -calmodulin 의존성으로, 세포내 칼슘이온에 의해 효소의 calmodulin 민감부위에서 활성화된다. 많은 양의 칼슘이온 유입은 nNOS를 활성화시켜 NO 생산을 증가시킬 수 있다. 이러한 nNOS의 활성화는 칼슘이온을 유입하고 동원시키는 시냅스후 신경전달물질 수용체에 달려 있을 뿐만 아니라, 전압 의존성 칼슘이온통로를 통해 칼슘이온의 유입을 유도하는 시냅스전 신경의 활동전위에 달려있다. 그러므로 Carrageenan 유도성 관절염은 primary afferent에서 지속적인 자극에 의해 계속적인 칼슘이온 유입과 NO를 생성시킬 수 있는 만성 염증모델이다. 이러한 변화는 시냅스 전달을 가능하게 하며, central sensitization 및 hyperalgesia와 같은 현상으로 나타난다.

전술한 바와 같이, NMDA 수용체는 central sensitization과 secondary hyperalgesia의 발생에 반드시 필요하다<sup>31)</sup>. 또한 이들은 CFA나 carrageenan, formalin에 의해 유발된 말초성 염증에서 발생하는 hyperalgesia와 관련이 있다. 척수에서 NMDA 수용체가 hyperalgesia와 관련이 있고 또한 NMDA 수용체와 NO가 매우 밀접한 관계에 있기 때문에, 척수에서 hyperalgesia를

발생시키는 일련의 과정에 NO가 중요한 역할을 하고 있다고 말할 수 있다.

Formalin을 발바닥내 주입하면 nNOS가 증가하는데, 이는 NO가 말초성 염증 후 발생하는 hyperalgesia의 증추기전에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 나타낸다. 또한 말초성 염증에 의해 유발되는 allodynia와 thermal hyperalgesia 및 central sensitization의 발생에 NO가 중요한 역할을 하고 있다는 증거도 있다<sup>32)</sup>. Kaolin과 carrageenan을 슬관절내 주입하여 유도한 급성 관절염 모델에서 비특이적 NOS 억제제인 L-NAME를 관절강내 주입한 결과 heat hyperalgesia를 완벽하게 억제시킬 수 있었으며, 슬관절의 부종 및 발열의 증가를 막을 수 있었다<sup>33)</sup>.

본 연구는 Carrageenan의 관절강내 주입에 의해 유도된 만성관절염 모델의 척수에서 nNOS 단백질의 발현을 분석한 결과, 이전에 연구된 결과들과 마찬가지로 척수에서 nNOS의 발현이 현저하게 증가되는 결과를 얻었다. 이 모델에 대방풍탕을 투여하거나 대방풍탕과 전침처치를 함께 하여 관절염에 의해 증가된 척수의 nNOS에 대한 이들의 효과를 분석한 결과, 대방풍탕은 척수에서 염증에 의해 증가된 NO 및 nNOS를 유의성 있게 감소시켰으며, 대방풍탕과 전침의 결합처치군은 척수에서 염증에 의해 증가된 NO 및 nNOS를 대방풍탕만 투여한 경우보다 약간 더 억제시켰다. 만성관절염에서 척수의 NO 및 nNOS 증가는 염증에 의해 통증이 발생한 것을 의미하며, 전침 자극을 가한 후 염증에 의해 증가된 NO 및 nNOS 단백질의 발현이 감소되었는다는 것은 만성관절염 모델에서 대방풍탕 혹은 대방풍탕과 전침의 결합처치가 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다. 만성 관절염에 의해 척수에서 증가된 NO가 대방풍탕의 투여나 대방풍탕과 전침의 결합처치에 의해 감소된 것

으로부터 여러 가지 기전을 생각해 볼 수 있는데, 이러한 처치에 의해서 arginine의 이용이 감소되었거나, NOS의 활성 및 발현이 감소되었거나 혹은 NADPH-diaphorase의 활성이 감소됨으로써 NO의 양이 감소될 수 있다. 또한 C-fiber에서 높은 진동수의 신경방전이 발생하여 척수에서 NO가 생성되기까지의 일련의 과정 중에서 이러한 처치들이 한 단계 또는 여러 단계를 억제시켜 염증에 의해 증가된 NO를 감소시킬 수도 있다. 염증에 의해 증가된 iNOS의 발현이 대방풍탕 단독치료 혹은 대방풍탕과 전침의 결합치료에 의해 감소되었지만, 이러한 치료들이 iNOS mRNA에까지 영향을 미칠지에 대해서는 더욱 연구가 되어야 한다.

구심성 신경의 종말에서 방출된 NO는 c-jun과 c-fos와 같은 immediate-early gene들의 발현을 초래할 수 있는데, 이러한 immediate-early gene들의 활성은 nociceptive dorsal horn circuit의 기능<sup>34)</sup> 뿐만 아니라 탐지할 수 있는 NOS의 양에 있어서 장기간의 변화를 초래한다. 슬관절염이 유도된 후 척수에서 nNOS가 3일째부터 유의성있게 증가되기 시작하여 14일째 최고로 증가하며 그 후로 점차 감소한다고 하는데, 이러한 실험결과는 NO에 의해 발현된 c-fos가 nNOS의 양을 장기간 동안 변화시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

iNOS는 칼슘 비의존성으로 원래 사이토카인에 의해 자극된 대식세포에서 발견되며, 다른 두 형태의 NOS보다 염증과 더욱 밀접한 관계에 있다. 독성을 나타낼 수 있는 양의 NO을 생산할 수 있는 NOS가 바로 iNOS이다. Adjuvant 유도성 관절염 동물에서 iNOS에 대한 immunoreactivity가 synovial tissue에서 나타난다고 한다<sup>34)</sup>. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine과 N-iminoethyl-L-lysine은 adjuvant 관절염과 관련

된 혈장 및 관절액에서 nitrite를 농도의존적으로 억제시킬 수 있었다. iNOS는 또한 central sensitization과 관련있다고 증명되었다. iNOS 선택적 억제제는 발바닥내 Zymosan을 주입하여 발생한 thermal hyperalgesia를 농도의존적으로 억제할 수 있다. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine은 thermal hyperalgesia를 차단시킬 수 있다. 척수에서 iNOS는 정상동물 및 adjuvant 관절염 동물에서 ependymal cell layer와 central canal 주위에 있는 ependymal cell의 process에 분포하고 있다고 보고되었다<sup>35)</sup>. Ependymal cell은 CNS에 있는 glial cell의 일종으로, 면역 및 염증반응에 관여한다. Hyperalgesia를 발생시키는 많은 말초자극들은 사이토카인과 같은 가용성 신호전달물질을 방출하여 척수나 뇌에 종결하고 있는 말초신경을 활성화시킨다. 말초 자극은 척수에서 glial cell들을 활성화시킬 수 있다. 척수의 glial cell은 사이토카인, NMDA 효현제, NO를 방출시킬 수 있다. iNOS의 발현은 주로 전사단계에서 조절된다. 그러므로 말초 염증이 있으면 이러한 인자들은 말초 뿐만 아니라 CNS에 있는 iNOS의 발현에 영향을 미칠 수 있다. Central canal을 둘러싸고 있는 부위는 serotonin, SP, glutamic acid decarboxylase, vasoactive intestinal polypeptide, calcitonin gene-related peptide와 같은 여러 신경화학물질들을 유의성있는 농도로 함유하고 있는 곳이다. Ependymal cell들은 central canal 근처에서 방출되는 물질에 의해 활성화된 후 iNOS를 상향 조절한다.

본 연구는 만성슬관절염을 유도한 후 대방풍탕을 매일 준 실험군, 대방풍탕과 전침 결합처치를 매일 한 실험군, 마취만 처치한 대조군에서 척수의 iNOS 발현양을 분석하였다. 그 결과 정상동물들에 비해 마취만 처치한 관절염 동물의

척수에서의 iNOS가 유의성 있게 증가되었으며, 대방풍탕 단독 혹은 대방풍탕과 전침 결합처치를 실시한 실험군은 관절염으로 인해 척수에서 증가된 iNOS를 유의성 있게 억제시켰다. 또한 대방풍탕과 전침을 함께 처치한 실험군이 대방풍탕만 처치한 실험군에 비해 iNOS가 유의성 있게 억제되었다. 만성관절염에서 척수의 iNOS 증가는 염증에 의해 central sensitization 및 hyperalgesia가 발생하였다는 것을 의미하며, 대방풍탕이나 대방풍탕, 전침의 결합치료를 시행한 후 염증에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현이 감소되었는다는 것은 만성관절염 모델에서 전침자극이 위의 두 과정을 억제함으로써 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

대방풍탕의 진통기전은 아직 밝혀진 바가 없으나, 전침의 진통기전중에는 serotonin 가설이 있다. 이 가설을 이용하여 본 만성관절염 모델에서 침의 진통기전을 추론해 본다면, 전침이 serotonin 분비를 억제시켜 ependymal cell의 활성화를 억제시킴으로써 iNOS를 억제시킨다고 생각할 수 있다. 그러나 여기에는 한 가지 문제와 한가지의 확인이 필요하다. 한가지 문제는 ependymal cell을 활성화시키는 신경화학물질에는 여러 가지가 있어서 전침자극이 serotonin 분비를 억제시킨다는 설만으로는 관절염에 의해 증가된 iNOS가 전침자극에 의해 유의성 있게 억제된다는 것을 설명하기가 어렵다는 것이다. 이러한 문제는 serotonin(5-HT) 길항제인 methysergide를 투여해 본다면 serotonin이 침의 진통작용과 어떤 관계가 있는지 바로 확인할 수 있을 것이다. 또한 serotonin이 대방풍탕의 진통작용과 어떤 관계가 있는지 연구한다면 대방풍탕과 전침을 결합처치했을 때 더욱 뛰어난 진통효과가 나타나는 이유에 대해 조금이나마 실마리를 풀 수 있을 것이다. 이러한 실험은 차후 이루

어져야 할 것이다.

교세포는 CNS를 지지해주는 역할을 하고 있지만 glutamate에 반응을 할 수 있게 하고 NO를 합성할 수 있다. 여기서 glutamate는 nNOS를 활성시켜 NO를 생성시킬 수 있는 물질로서 iNOS와 nNOS의 발현에 공통적으로 관여하는 물질이다. 대방풍탕이나 대방풍탕과 전침의 결합처치가 관절염모델에서 glutamate를 억제시킬 수 있다면 iNOS와 nNOS의 억제현상을 동시에 설명하는 것이 가능할 것이다. 이것 또한 차후 실험을 해서 밝혀야 할 사항이다. 이 이외에도 대방풍탕 혹은 대방풍탕과 전침의 결합처치가 관절염에 의해 증가된 iNOS를 억제시키는 기전에 대해서는 더 연구를 해야 할 것이다. 그리고 만성 슬관절염이 유도된 후 슬관절에 병리학적 변화가 생기는데, 이러한 치료들이 슬관절에 병리변화에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 더욱 연구가 되어야 한다.

NO는 Carrageenan 유도성 슬관절염 모델에서 말초 염증에 의해 발생된 central sensitization 및 hyperalgesia와 밀접하게 관련되어 있다고 전술하였다. iNOS와 nNOS는 각각 다른 기전을 통하여 NO 합성에 기여하고 있다. iNOS와 nNOS를 차단하면 Carrageenan 슬관절염에서의 통증을 막거나 제거할 수 있을 것이며, 이는 임상에서의 류마티스 관절염에도 적용되는 것이다. 관절염으로 증가된 iNOS 및 nNOS를 억제시키는 대방풍탕 및 전침의 효과는 이러한 치료들이 만성슬관절염을 치료하는 유용한 치료법이 될 수 있음을 시사하는 것이며, 특히 한의학에서 류마티스 관절염을 치료하는데 있어 침치료를 하면서 약물치료를 병행하는 것이 더욱 우수한 치료효과를 나타낼 수 있다는 것을 간접적으로 증명하고 있다. 또한 이러한 결과들은 류마티스 관절염으로 고생하는 환자들에게 하나의 치료방

법으로 이용할 수 있음을 실험적으로 입증하는 것이다.

COX는 arachidonic acid를 prostglandin으로 전환시키는 역할을 하는 효소이다<sup>35)</sup>. COX에는 COX-1과 COX-2로 2가지 효소가 있는데, 이들은 서로 아미노산의 60% 정도가 동일하며, 비슷한 효소작용을 가지고 있다. COX-1은 house keeping gene으로 COX-1에 의해 생성된 prostaglandin은 위점막의 세포 보호, 심장의 혈관 확장 및 thromboxane의 합성에 관여한다. 반면 COX-2는 immediate early gene으로 염증반응, 배란 과정 및 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 대부분의 조직에 본질적으로 존재하는 효소임에 비해, COX-2는 정상상태에서는 의미있게 증가하지 않으나, 염증 cytokin, mitogen, 성장인자 또는 phorbol ester 같은 종양 유도 물질에 의해 증가한다.

정상적인 생리상태에서 COX 단백질의 발현은 COX-1이 필요한 방어 기전을 수행하고 있지만 비정상적인 상황과 같은 상처, 병의 발현, 임신과 같은 상황에서는 COX-2 단백질이 유도되어서 COX-1과는 달리 COX-2의 발현은 제한된 상황에서만 일어나는 현상으로서 대장의 상피조직을 관찰한 결과 비정상적인 세포 조직은 주위의 정상적인 조직과 현격한 대조를 이루고 있어서 대장의 상피 조직에서의 암으로 변환하는 조직을 진단하는데 그 표시로서 사용될 수 있다고 하는데 면역조직화학의 비정상적 발달과 다른 중요 기관의 비정상을 초래하는 중요한 원인이 되어서 이들 두 종류의 COX 단백질의 작용 특이성을 잘 보여주었다. COX 단백질 염색을 통한 대장암 조직 관찰 결과에서도 COX-1의 발현은 거의 발견되지 않은 수준이지만 COX-2의 발현은 2배에서 50배까지의 높은 염색된 세포를 발견할 수 있었다<sup>36)</sup>.

염증반응에 의하여 COX-2가 변화하는 동안에도 척수에서의 COX-1의 발현양은 전혀 변화가 없었다. 또한 COX-2 억제제를 이용한 관절염의 연구를 보게되면 반드시 일치된 견해는 보이지 않고 있다. 한 연구에서는 COX-2 억제제에 의하여 혈장의 삼출액, PGE2의 생성, granuloma 및 혈관 신생작용이 억제됨으로서 류마티스 관절염에 효과적이었다고 보고하고 있으나 COX-2 억제제가 monoarthritic rat에서 효과가 없었다는 연구보고도 있다<sup>37)</sup>.

여러 자극에 의하여 활성된 c-Fos 유전자는 전사와 번역과정을 거쳐 c-Fos 단백질이 합성된다. c-Fos 단백질은 다른 형태의 oncogene인 jun 유전자에서 발현된 Jun 단백질과 결합하여 이중결합체를 형성하며 이것은 다시 핵으로 이동하여 DNA의 activator protein one site (AP-1)에 결합한다. 이러한 결합은 세포에서 다른 유전자의 전사를 조절하여 다양한 세포기능을 조절함으로써 c-Fos 단백질은 일명 전사인자(transcription factor) 또는 제 3의 번역인자로 불리운다. 중추신경계 뉴론들에서 c-Fos 단백질은 다양한 흥분성 반응에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있는데 간질유발약물, 고농도 칼륨, 흥분성 후시냅스성 전위, 전기자극, 통증 유발 등에 의하여 대뇌 피질, 해마, 척수의 후근뉴론 등에서 c-Fos 단백질이 발현된다. c-Fos 단백질의 발현은 흥분적 자극 후 20분 이내에 시작되어 24시간 이상 지속됨으로써 myc, jun, kroc 등과 함께 일명 immediate-early gene protein이라 하고 세포내 대사활동성의 변화를 측정하는 표식자로 널리 이용되고 있다. 특히 Hunt 등<sup>38)</sup> 처음으로 마취된 흰쥐의 말초부위에 유해성 자극을 가하여 척수에 존재하는 신경 세포에서 c-Fos 단백질을 관찰하였고, 그 뒤 다양한 유해성 자극에 대한 통증 정도를 확인하는데 활용되

었으며, 흰쥐에서 하지의 피하에 formalin 주입 시 척수 및 후근 신경절에서 시간경과에 따른 c-Fos 단백질의 발현 양상 및 척수 부위별 분포 양상이 관찰되었다<sup>39)</sup>. c-Fos 단백질이 formalin 주입 후 척수 수준에서 발현하며, 이것이 통증 반응을 반영하는 것으로 알려져 있으나, 그에 대한 역할에 대하여 정확히 알려져 있지는 않다. 그러나 통각에 대한 척수내 신호처리과정에 관여한다고 추정되고 있으며, Fos mRNA antisense oligonucleotide를 척수강 주입한 후 흰쥐 척수 후근 신경 세포들에서 formalin에 의한 preprodynorphin mRNA의 전사를 억제하고 제2차 통증반응을 억제한다고 보고되고 있다<sup>40)</sup>. 따라서 Jun계 단백질과 함께 c-Fos 단백질이 다양한 통각자극에 의해 발현되며 preprodynorphin, preproenkephalin과 같은 유전자의 전사를 조절함으로써 장시간 동안 척수내 통증신호전달 체계의 기능 변화를 초래한다고 한다.

이 연구는 만성통증 모델로서 carrageenan으로 유도한 관절염 모델을 사용하여 대방풍탕 약침의 진통효과와 항염증효과를 알아보았으며, 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 대방풍탕 약침은 carrageenan으로 유도한 관절염 모델에서 환측 약침 자극은 농도 의존적으로 진통효과를 발휘하였으며, 건측, 원위혈위 자극보다 환측 근위혈위 자극이 보다 유의한 효과를 나타내었다. 대방풍탕의 진통효과는 전침과 병용했을 때 더욱 효과적이었다. 아울러 대방풍탕 약침은 말초 염증으로 인해 척수에서 증가한 NO 및 iNOS, COX-2 단백의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과를 종합하면 대방풍탕 약침은 carrageenan으로 유도한 관절염 통증에 진통효과가 있으며, 염증 유발 인자를 억제하는 기전에

부분적으로 NO와 COX 경로가 관여하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 관절염 동물모델에서 대방풍탕 약침이 관절염에 의해 감소된 WBF에 미치는 효과와 척수에서 통증지표 중 하나인 NO 생성 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현양상에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Carrageenan으로 유도한 관절염으로 감소된 WBF에 대해 대방풍탕은 유의한 개선을 보여주었으며, 이러한 진통효과는 적어도 9시간 정도 유지되었고 농도 의존적이었다.
2. 대방풍탕 100 mg/ml, 200  $\mu$ l 약침은 인도메타신 3 mg/kg의 진통효과에 해당하는 강도의 진통효과를 거두었다.
3. 대방풍탕 약침은 건측 자극에 비하여 환측 자극이 더욱 강력한 진통효과를 나타내었고, 원위 취혈보다 근위 취혈이 효과가 좋았다.
4. Carrageenan으로 유도한 관절염에 대방풍탕 약침과 함께 건측 족삼리 전침 자극은 강력하고 지속적인 진통효과를 나타내었다.
5. Carrageenan으로 유도한 관절염에서 대방풍탕 약침은 척수에서 증가된 NO 생성 및 iNOS, COX-2 발현을 유의하게 억제하였다.

본 연구의 결과들은 만성 관절염 모델에 있어서 대방풍탕 약침이 진통효과와 함께 항염증 작용을 나타내는 것을 보여주었다. 그러나 대방풍탕의 진통기전에 대해서는 NO-COX 계통 외에 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의 학사. 1993 : 151, 156, 162, 175.
2. 이문호. 내과학. 서울 : 학림사. 1986 : 1695.
3. 崔容泰外, 最新鍼灸學, 서울 : 成輔社. 1983.
4. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 北京 : 人民衛生出版社. 1985 : 42-3.
5. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울 : 成輔社. 1991 : 79.
6. 失敷道明. 最新韓方處方解說. 대구 : 東洋綜合通信教育院出版部. 1986 : 407-8.
7. Lee DH, Kang SS, Chang IM, Mar WC. Detection of anti-inflammatory agents from natural products as inhibitors of cyclooxygenase I and II, Natural Product Sci. 1997 ; 3 : 19-28.
8. Arend WP. Jean-Michel Dayer, Cytokine and Cytokine inhibitors or Antagonists In Rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum. 1990 ; 33(3) : 305-15.
9. 해리슨번역 편찬위원회. Harrison 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 1777.
10. K. Morgan, R. B. Clague, I. Reynolds and M. Davis, Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis, Brit. J. Rheum. 1993 ; 32 : 333-5.
11. 박동준, 김동집. 류마티스관절염의 병인. 대한 류마티스학회지. 1994 ; 1 : 1-12.
12. Prue H. Hart, Gerard F. Vitti Diana R. Burgess, Genevieve A. Whitty, Diana S. Piccoli, and John A. Hamilton, Potential antiinflammatory effects of interleukin 4, Suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989 ; 86 : 3803-7.
13. Joseph McDonnell, Lori A. Hoermer, Michael W. Lark, Coral Harper, Tanvi Dey, Julie Lobner, Gerge Eiermann, Diana Kazazis, Irwin I. Singer, Vernon L. Moore, Recombinant human interleukin-1 $\beta$ -induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. Arthritis Rheum. 1992 ; 35(7) : 799- 805.
14. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B, Furst D, Goldsmith C, Kieszak S, Lightfoot R, et al. The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. Arthritis Rheum. 1993 ; 36(6) : 729-40.
15. Burckhardt CS. The impact of arthritis on quality of life. Nursing Res. 1985 ; 34(1) : 1-9.
16. 朴炳坤. 增補韓方臨床40年. 서울 : 大光文化社. 1989 : 343.
17. 張介賓. 景岳全書(上). 서울 : 大成文化史. 1985 : 43, 410.
18. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 臺北 : 超人出版社. 1974 : 11-2.
19. 李梃. 原本編註醫學入門(下). 서울 : 南山堂. 1866 : 124, 452, 453.
20. 정석희. 瘰病의 문헌적 연구. 大韓韓醫學會誌. 1995 ; (16)1 : 10.
21. 姜仁守. 瘰證治療의 用藥에 관한 小考. 大韓韓醫學會誌. 1990 ; (11)1 : 245-52.
22. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울 : 南山堂. 1993 : 218-9.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 범인문화사. 1999 :

- 788-9.
24. 田元準. 대방풍탕의 LPS유발 관절염 완화효과에 관한 실험적 연구. 동국대 한의학연구소 논문집. 2000 ; 19 : 42.
  25. 崔斗善. 대방풍탕이 흰쥐의 장기조직에 미치는 영향. 한의학연구소 동의한의연. 1999 ; 3 : 53.
  26. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis, *Exp Brain Res.* 1998 ; 118 : 457-65.
  27. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain, *Nature* 1988 ; 326 : 385-7.
  28. Malmberg AB, Yaksh TL. Spinal nitric oxide synthesis inhibition block NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats, *Pain.* 1993 ; 54(3) : 291-300.
  29. Traub RJ, Solobkin A, Meller ST, Gebhart GF. Spinal cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide synthase immunoreactivity increase following carrageenan-produced hindpaw inflammation in the rat, *Brain Res.* 1994 ; 668 : 204-10.
  30. Woolf CJ. Recent advances in the pathophysiology of acute pain, *Br J Anaesth.* 1989 ; 63 : 139-46.
  31. Dougherty PM, Palecek J, Paleckova LS, Sorkin LS, Willis WD. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli, *J Neurosci.* 1992 ; 12 : 3025-41.
  32. Yang LC, Masala M, Ysksh TL. Characterization of time course of spina cord amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation : a chronic microdialysis study, *Pain.* 1996 ; 67 : 345-54.
  33. Lawand NB, Willis WD, Westlund KN. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, *Neuro Report.* 1997 ; 8 : 895-9.
  34. Cannon JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase, *Eur J Pharmacol.* 1995 ; 273 : 15-24.
  35. Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase : regulation and enzyme expression. *Biochim Biophys Acta.* 1991 ; 1083 : 121-34.
  36. Dong YL, Gangula PRR, Fang L, Yallampalli C. Differential expression of cyclooxygenase-1 & -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. *Prostaglandins.* 1996 ; 52 : 13-34.
  37. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs cyclooxygenase-2 inhibitor in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology.* 2001 ; 40(7) : 937-46.
  38. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of cFos

- like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. 1987 ; 328 : 632-4.
39. Gagas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory controls : correlation of nociceptive behaviour and cFos expression. *Neurosci*. 1991 ; 42 : 617-28.
40. Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hunghes J. cFos antisense oligodeoxynucleotide increase formalin induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neurosci*. 1995 ; 65 : 485-92.