

## 灸津(Moxi tar)이 免疫細胞에서 iNOS 합성에 미치는 影響

안성훈 · 구성태 · 도진우 · 김종성 · 김광수 · 양범식 · 김경식 · 손인철\*

### The Effects of Moxi tar on iNOS Synthase in RAW 264.7 Cell

Sung-Hun Ahn · Sung-Tae Koo · Jin-Woo Do · Jong-Sung Kim · Kwang-Soo Kim ·  
Beom-Sik Yang · Kyung-Sik Kim · In-Chul Sohn\*

\*Dept. of AM-Meridian & Pointology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### Abstract

This study was produced to examine the effects of moxibustion that had been played a role of traditional oriental medical treatment on disease. We used LPS and INF-gamma in RAW 264.7 cell line to produce Nitric Oxide(NO). And results was that Moxi tar decreased NO in activated RAW 264.7 cell by LPS and INF-gamma significantly, which was decreasing Nitric Oxide Synthase. So we proposed that Moxi tar had anti-inflammation and anti-cytotoxicity in RAW 264.7 cell by decreasing Nitric Oxide Synthase.

#### I. 緒 論

뜸쑥(애엽; 艾葉 Folium Artemisiae Lavandulaefolia)은 菊花科(Compositae)에 속한 多年生 草本인 참쑥(*Artemisia lavandulaefolia* DC.) 및 황해쑥(*Artemisia argyi* Lev. et Vant.)과 野艾(*A. vulgaris* L.)의 잎을 건조한 것<sup>1)</sup>으로, 병증에 상응한 부위에 애음을 부착하여 연소시킴으로써 얻어지는 온열 자극과 연소과정에서 발생하는 물질에 의한 화학적 자극으로 병을 치료하는 자극요법을 艾灸療法이라 칭한다<sup>2)</sup>. 素問<sup>3)</sup> 異法方宜論의 “北方者 天地之所閉藏之域也 其地高陵居 風寒水冽 其民藥野處而乳食 藏寒生滿病 其治宜艾熯 故艾熯者 亦從北方來”에서 그 起源을 찾아볼 수 있으며, 調理氣血, 逐寒濕, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 等の 症狀을 治療<sup>4),5)</sup>한다.

Nitric oxide(NO)는 1990년 초에 동물세포

에서 세포간의 messenger로서 생성된다는 것을 발견하였다. 그 당시 NO는 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성 뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다<sup>6)</sup>. 또한 NO는 EDRF (endothelium-derived relaxing factor) 이라는 보고가 있었으며<sup>7)</sup>, NMDA receptor와 관계되어  $Ca^{2+}$ 와 관계된다는 보고<sup>8),9)</sup>가 있었다. 이러한 작용외에 NO 자체는 화학적으로 불안정한 gas체로 반감기 수초가 지나면 nitrite( $NO_2$ ), nitrate( $NO_3$ ) 등의 안정한 화합물로 존재하게 되며, 이 과정에서 형성되는 peroxynitrite anion( $ONOO^-$ ), superoxide ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  등이 세포내 독소작용을 야기한다.

최근에 연구된 艾灸療法의 效用을 증명하려는 趨勢는 크게 溫熱刺戟에 의한 보고와 艾絨의 燃燒生成物, 즉 化學的 刺戟에 의한 보

Key Words : Moxibustion, Moxi tar, Nitric Oxide, iNOS

\* : 원광대학교 한의과대학 경혈학교실

고로 나누어진다. 溫熱刺戟에 대한 연구로 林<sup>10-11)</sup>은 溫熱刺戟이 국소조직에 대하여 열분해 물질을 생성하여 치료효과를 나타낸다고 보고하였고, 華<sup>12)</sup>는 溫熱의 弱刺戟은 補의 작용을 일으키고 強刺戟은 瀉의 작용을 일으킨다고 보고하였다. 化學的 刺戟에 대한 연구로 西谷郁子は 艾絨의 燃燒生成物만을 이용해 疣贅治驗의 症例를 보고하였고<sup>13)</sup>, 또 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 과산화지질을 저하하는 작용은 艾灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 보고하였다<sup>14)</sup>.

이에 著者は 艾灸의 燃燒生成物이 人體에 刺戟因子가 될 수 있으며, 이러한 刺戟이 人體 疾病을 治療하는 하나의 수단이 될 수 있음을 假定하고, Nitric Oxide의 生成與否, 세포생존률, iNOS의 생성여부에 관한 실험을 진행하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗方法 및 材料

### 1. 뜸 抽出物 採取

삼각 플라스크 입구에 개목 링을 올려놓고, 1 회마다 원광대학교 한의과대학 경혈학교실 실험용으로 사용되는 뜬쑥(봉래구관, 서울) 5g을 뜬 썰거를 이용하여 원뿔 모양으로 만든다. 다음 넓은 면을 아래로 개목 링위에 올려놓고, 불을 붙여서 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 뜬 tar를 모은다. 뜬쑥이 타면서 침강하는 tar 성분이 더 이상 나오지 않으면 버리고, 새로운 뜬으로 대체하기를 반복한다. 플라스크 바닥에 모인 뜬 tar를 methanol 100%로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고 40±2°C를 증탕증류기를 이용하여 methanol을 90% 증발시킨다. 남은 tar성분과 methanol 혼합물을 -70°C의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨 후, culture용 DMSO(sigma)

를 용매로 100mg/ml의 농도로 분류하여 실험에 사용하였다.

### 2. RAW 264.7 cell 세포주 배양

Rat의 면역세포인 RAW 264.7 celline(원광대학교 의과대학 해부학교실 기증)을 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 5% fetal bovine serum (Gibco BRL Co)이 포함된 RPMI (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 계대배양하였다.

### 3. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성의 측정

배양액속의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도는 Ding 등의 방법<sup>†</sup>에 따라 결정하였다. 간기하면, 100ul의 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide / 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride / 2.5%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 섞고 실온에서 10분간 반응시킨 후, Emax S/N C10274(Molacula Device, MD, U.S.A.)를 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도는 sodium nitrite를 계대 희석하여 흡광도를 재어 표준곡선을 작성하여 얻어냈다.

### 4. 세포 생존률 측정

세포의 생존률 측정은 MTT(sigma Co, St. Louis, MO) assay를 이용하였다. 세포배양판(96-well plate, 24-well plate)에 세포를 200μl와 1ml씩 분주한 후, 24시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정화시켰다. MTT 10%를 Media로 용해하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기에 배양한다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 100% iso-propranol 용액으로 24시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 방치한 다음 Emax S/N C10274 (Molacula Device, MD, U.S.A.)로 565nm의 흡광도에서 측정하였다.

† Ding A.H., C.F.Nathan, and D.j. Stuehr.(1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from peritoneal macrophages. J. Immunol., 141: 2407-2412

## 5. Western blotting

별아교세포와 macroglial cell을 LPS 및 여러 신호전달 억제제를 처리한 일정 시간 후에 채취하여 냉 HBSS로 2회 세척한다. 얻어진 별아교세포는 세포용해 용액(RIPA 용액:50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1  $\mu$ l/ml aprotinin)으로 얼음에서 30분 처리한다. 13,000 rpm에서 20분 원심분리하여 얻은 세포부유액은 bicinchoninic acid solution(BCA, Sigma Co., St. Louis, USA)을 이용하여 정량한다. 동량의 세포부유액은 2 X Laemmli sample buffer와 섞어 100°C에서 5분 끓인 후에 10% sodium dodesylsulfate-poly acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행한다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA로 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시킨다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시킨다. iNOS항체는 0.01%의 Tween-20이 포함된 5% skim milk/Tris- buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated hotse radish peroxidase(Amersham, England)와 1시간 반응시킨다. Nitrocellulose membrane은 TBS-T로 3번 세척 후에 enhanced chemiluminescence kit(ECL, Amersham, England)를 이용하여 발색시킨 후에 필름에 현상한다.

## 6. LDH release assay

Lactate dehydrogenase (LDH) release assay는 세포괴사율을 측정할 수 있는 colorimetric 방법으로 세포배양시 괴사된 세포는 LDH를 배지로 방출한다. 방출된 LDH는 colorless tetrasolium salt를 넣으면 환원된

형태의 colored formazan을 형성하는데 이 흡광도를 측정하여 LDH의 활성도를 결정할 수 있다. 다양한 농도의 뜸추출물을 48h 노출시킨후에 배지만을 추출하여 tetrazolium salt를 넣고 이 때 형성된 formazan을 ELISA reader에서 490-492nm 필터를 이용하여 측정하였다.

## 7. 통계처리

NO의 생성량은 standard curve를 이용하여 수치를 환산하였다. MTT assay와 LDH release assay로 측정된 수치는 control의 평균수치를 100으로 환산하여 계산하였다. 환산된 수치를 컴퓨터 통계프로그램인 Minitab for windows 12.1 (Minitab Inc.)을 이용하여 평균분석(one way ANOVA)을 하였다. 검정 방법은 변수가 2개항일 경우는 pared T-test를 사용하였고, 다변수일 경우는 Tukey's pairwise comparisons를 사용하였고, 검정시 P값은 0.05로 정하여 산출하였다. 비교항을 영문대문자로 표기하였고, 0 이하의 값을 O, 0 이상의 값을 X로 표기하였으며, 사후검정시 OO와 XX는 유의값이다.

## Ⅲ. 實驗結果

### 1. 燃燒反應후 艾灸의 質量的 變化

燃燒反應 후 灸津의 質量變化는 다음과 같았다. 먼저 5.00g의 艾灸를 뜸을 만들어 실온에서 燃燒反應을 시킨 결과 0.019667±0.003667 g의 燃燒生成物을 얻을 수 있었다. 이 燃燒生成物을 methanol 100%를 이용하여 녹인 후, column으로 불순물을 제거하여 methanol과 tar 혼합액을 만들고 이를 -72°C의 냉동동결건조기로 凍結乾燥하여 tar 추출물을 얻었다. 이는 油象의 질은 검갈색 액체로 상온에서 고체상태로 존재하며 뜸 燃燒시 발생하는 특유의 芳香性을 지닌다. 또한 열에 대하여 可逆的 性質을 가지며 非親水性의 性

質을 가진다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. The mass alternation of Moxi after oxidate reaction (g)

|          | Means       | SD       |
|----------|-------------|----------|
| Cont     | 5.00233     | 0.000577 |
| Moxi tar | 0.019667*** | 0.003667 |

Oxidate reaction was produced on the paper in RT. and then after paper mass checked, tar mass was calculated. Cont means the mass of Moxi before oxidate reaction, Moxi tar means the mass of Moxi tar after oxidate reaction. \*\*\*( $P < 0.001$ )

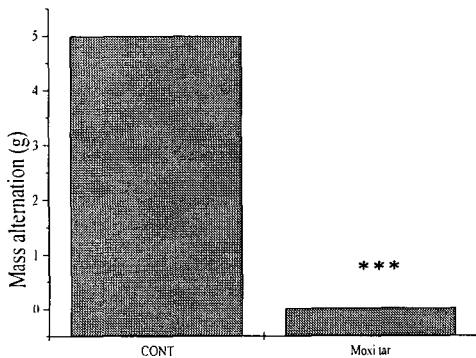


Fig. 1. The mass alternation of Moxi after oxidate reaction. The mass of Moxi was checked by three times using mass meter. Oxidate reaction was produced on the paper in RT. and then after paper mass checked, tar mass was calculated. Cont means the mass of Moxi before oxidate reaction, Moxi tar means the mass of Moxi tar after oxidate reaction.

## 2. LPS와 INF-gamma에 의한 NO의 생성

다음은 bacterial products end 하나인 LPS를 이용하여 NO를 생성한 결과이다. 자극후 24시간 후의 결과로 control은  $2.53623 \pm 0.16603 \mu M$ 의 NO를 생성하였고, LPS+INF群은  $14.27536 \pm 0.84429 \mu M$ 이 생성되어 control과 분명한 차이를 보였다. 이로써 LPS가 면역세포에서 NO를 생성함을 확인하였다 (Table 2, Fig. 2).

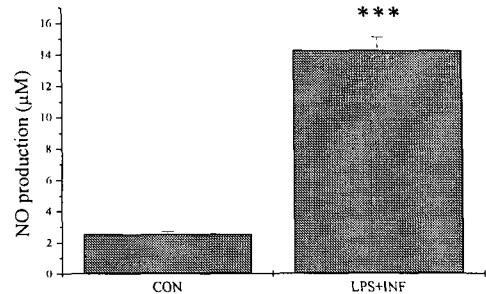


Fig. 2. NO production by LPS+INF- $\gamma$  in RAW 264.7 cell.  $2 \times 10^5$  cells were cultured per well for 24 hours with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. LPS+INF- $\gamma$  means LPS  $1 \mu g/ml$  + INF- $\gamma$  20 unit. Triplicate.

Table 2. NO production by LPS+INF- $\gamma$  in RAW 264.7 cell ( $\mu M$ )

|         | Means       | SD      |
|---------|-------------|---------|
| CON     | 2.53623     | 0.16603 |
| LPS+INF | 14.27536*** | 0.84429 |

CON was control, and LPS+INF was LPS  $1 \mu g/ml$  + INF-gamma 20 unit/ml. \*\*\*( $P < 0.001$ )

## 3. 灸津에 의한 NO 생성률測定

다음은 灸津에 의하여 NO가 생성되는지에 대한 조사를 하였다. 측정방법으로는 griess assay를 이용하여 cell이 약물자극후 24시간이 지난  $100 \mu l$ 의 media를 측정하였다. control群은  $3.04348 \pm 0.15372 \mu M$ 의 NO가 생성되었고, 灸津  $1 \mu g/ml$ 에서는  $3.04348 \pm 0.30744 \mu M$ 의 NO가 생성되었으며, 灸津  $10 \mu g/ml$ 群에서는  $3.15217 \pm 0.15372 \mu M$ 의 NO가 생성되었고, 灸津  $50 \mu g/ml$ 群에서는  $3.91304 \pm 0.15372 \mu M$ 의 NO가 생성되었다. 이로써 NO가 灸津  $50 \mu g/ml$ 群에서 다소 생성되었으나 그 양은 극히 미미하였다 (Table 3, Fig. 3).

灸津(Moxi tar)이 免疫細胞에서 iNOS합성에 미치는 影響

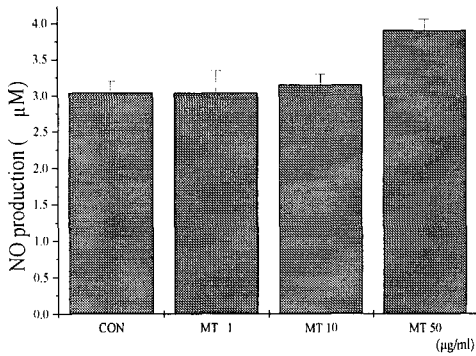


Fig. 3. The effects of Moxi tar on Nitric Oxide production by dose dependent. RAW cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. 100µl of serum was used with griess reagent and checked at 540nm spectrometer.

Table 3. The effects of Moxi tar on Nitric Oxide production by dose dependent (µ M)

|             | Means   | SD      |
|-------------|---------|---------|
| CON         | 3.04348 | 0.15372 |
| MT 1µ g/ml  | 3.04348 | 0.30744 |
| MT 10µ g/ml | 3.15217 | 0.15372 |
| MT 50µ g/ml | 3.91304 | 0.15372 |

RAW cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MT was Moxi tar.

Tukey's pairwise comparisons : CONT (A), MT 1 µ g/ml (B), MT 10µ g/ml (C), MT 50µ g/ml (D), AB; OX, AC; OX, AD; OO, BC; OX, BD; OO, CD; OO

4. 灸津刺戟에 의한 細胞 活性度 測定

다음은 灸津에 의한 세포 활성도를 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 측정시간은 灸津의 dose 별로 群을 만들어 자극후 24시간후에 media에 MTT 10%를 첨가하여 세포배양기에 4시간 정도 안정화시킨다음, iso-proprianol을 이용하여 검출하였다. control을 100이라 정하였을 때, 灸津 1µ g/ml群에서는  $116.522 \pm 23.750\%$ 이었고, 灸津 10µ g/ml에

서는  $91.841 \pm 24.516\%$ 이었으며, 灸津 50µ g/ml에서는  $88.667 \pm 29.636\%$ 이었다(Table 4, Fig. 4).

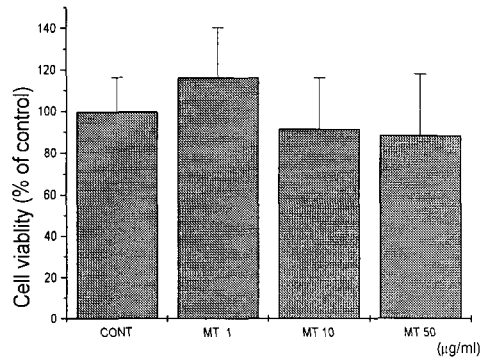


Fig. 4. The cell viability of Moxi tar treatment in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was produced for 3 hours in incubator.

Table 4. The cell viability of Moxi tar treatment in RAW 264.7 cell (µ M)

|             | Means   | SD     |
|-------------|---------|--------|
| CON         | 100.000 | 16.376 |
| MT 1µ g/ml  | 116.522 | 23.750 |
| MT 10µ g/ml | 91.841  | 24.516 |
| MT 50µ g/ml | 88.667  | 29.636 |

RAW 264.7 cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was produced for 3 hours in incubator.

Tukey's pairwise comparisons : CONT (A), MT 1 µ g/ml (B), MT 10µ g/ml (C), MT 50µ g/ml (D), AB; XX, AC; XX, AD; XX, BC; XX, BD; XX, CD; XX

5. LPS와 INF-gamma에 의한 NO 生成에 灸津이 미치는 影響

다음은 LPS와 INF-gamma에 의하여 생성된 NO에 灸津이 어떠한 영향을 미치는가에

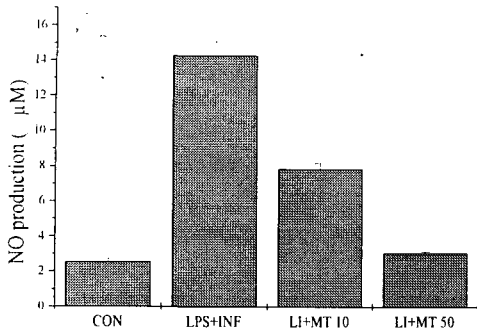


Fig. 5. The effects of Moxi tar treatment on NO production with LPS+PMA in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was produced after 3 hours in incubator. Triplicate.

대한 조사를 하였다. 측정방법으로는 griess assay를 이용하여 cell이 약물자극후 24시간이 지난 100µl의 media를 측정하였고, LPS와 INF-gamma, 灸津은 동시에 자극되었다. control群은  $2.53623 \pm 0.16604 \mu M$ 의 NO가 생성되었고, LPS+INF-gamma 群은  $14.27536 \pm 0.84429 \mu M$ 의 NO가 생성되었으나, LI+灸津 10µ g/ml群에서는  $7.86232 \pm 0.33207 \mu M$ 의 NO검출로 NO가 감소되었으며, LI+灸津 50µ g/ml群에서는  $3.07971 \pm 0.06276 \mu M$ 의 NO가 검출되었다. 이로써 灸津이 LPS와 INF-gamma가 미치는 NO 유발 자극을 감소시키는 것으로 확인되었다. 실험에 사용된 LPS는 1µ g/ml이었고, INF-gamma는 20unit/ml이었다(Table 5, Fig.5).

### 6. 灸津과 LPS, INF-gamma 처리시 細胞 活性化 測定

다음은 灸津과 LPS, INF-gamma 처리시 세포에 미치는 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 측정시간은 群별로 자극 후 24시간후에 media에 MTT 10%를 첨가하여 세포배양기에 4시간 정도 안정화시킨다음, iso-propranol을 이용하여 검출하였다. 검출

Table 5. The effects of Moxi tar treatment on NO production with LPS+PMA in RAW 264.7 cell (µ M)

|            | Means    | SD      |
|------------|----------|---------|
| CON        | 2.53623  | 0.16604 |
| LPS+INF    | 14.27536 | 0.84429 |
| LI + MT 10 | 7.86232  | 0.33207 |
| LI +MT 50  | 3.07971  | 0.06276 |

CON was control. LPS+INF was LPS 1µg/ml + INF-gamma 20unit/ml. LI+MT 10 was LPS 1µg/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10 µg/ml. LI+MT 50 was LPS 1µg/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10 µg/ml.

RAW 264.7 cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Triplicate.

Tukey's pairwise comparisons : CON (A), LPS+INF (B), LI+MT 10 (C), LI+MT 50 (D), AB; OO, AC; OO, AD; OX, BC; XX, BD; XX, CD; XX

결과, control을 100이라 정하였을 때, LPS+INF-gamma 群에서는  $100.8095 \pm 13.8054\%$  이었고, LI+灸津 10µ g/ml에서는  $88.3806 \pm 4.5794\%$ 이었으며, LI+灸津 50µ g/ml에서는  $75.1905 \pm 0.7408\%$ 이었다. 실험에 사용된 LPS는 1µ g/ml이었고, INF-gamma는 20 unit/ml이었다(Table 6, Fig. 6).

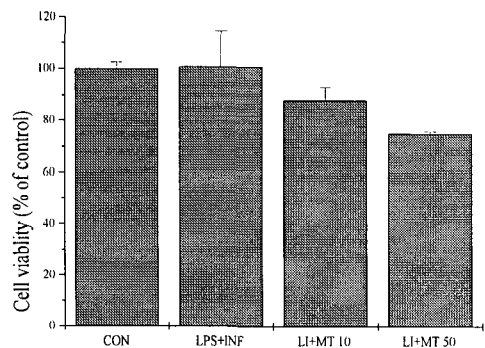


Fig. 6. The cell viability of LPS, INF and Moxi tar treatment in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were cultured by  $2 \times 10^4$ /well, cultured for 24h with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was produced for 3 hours in incubator.

灸津(Moxi tar)이 免疫細胞에서 iNOS합성에 미치는 影響

Table 6. The cell viability of LPS, INF and Moxi tar treatment in RAW 264.7 cell (% of control)

|          | Means    | SD      |
|----------|----------|---------|
| CON      | 100      | 2.5591  |
| LPS+INF  | 100.8095 | 13.8054 |
| LI+MT 10 | 88.3806  | 4.5794  |
| LI+MT 50 | 75.1905  | 0.7408  |

CON was control. LPS+INF was LPS 1 $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml. LI+MT 10 was LPS 1 $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10  $\mu$ g/ml. LI+MT 50 was LPS 1 $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10  $\mu$ g/ml.

RAW 264.7 cell were cultured by 2\*10<sup>4</sup>/well, cultured for 24h with 10% FBS serume RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. MTT assay was produced after 3 hours in incubator. Triplicate. Tukey's pairwise comparisons : CON (A), LPS+INF (B), LI+MT 10 (C), LI+MT 50 (D), AB; OX, AC; OX, AD; OO, BC; OX, BD; XX, CD; OX

7. 灸津과 LPS, INF-gamma 처리시, iNOS에 미치는 影響

灸津에 의해서 감소되는 NO가 어떠한 영향을 받아서 감소되는지를 알아보기 위한 한 방법으로 western blot을 이용하여, iNOS의 생성여부를 조사하였다. Fig. 7을 관찰하면, 124kda에서 iNOS의 생성이 관찰되었으며, 그 양은 control에서는 거의 관찰되지 않았고, LPS+INF-gamma 群에서는 약 1cm 두께로 iNOS가 관찰되었다. LI+灸津 10 $\mu$  g/ml에서도 약 1cm 두께로 iNOS가 관찰되었으며, LI+灸津 50 $\mu$  g/ml에서는 iNOS의 양이 많이 감소하여 두께 약 2mm이고 색깔도 많이 약해져 농도가 많이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 7).

8. 免疫細胞에서 灸津과 LPS+INF-gamma 자극 시, Morphology 관찰

다음은 LM사진을 통하여 免疫細胞의 모양을 관찰하였다. Fig. 10-a는 免疫細胞의 활성화

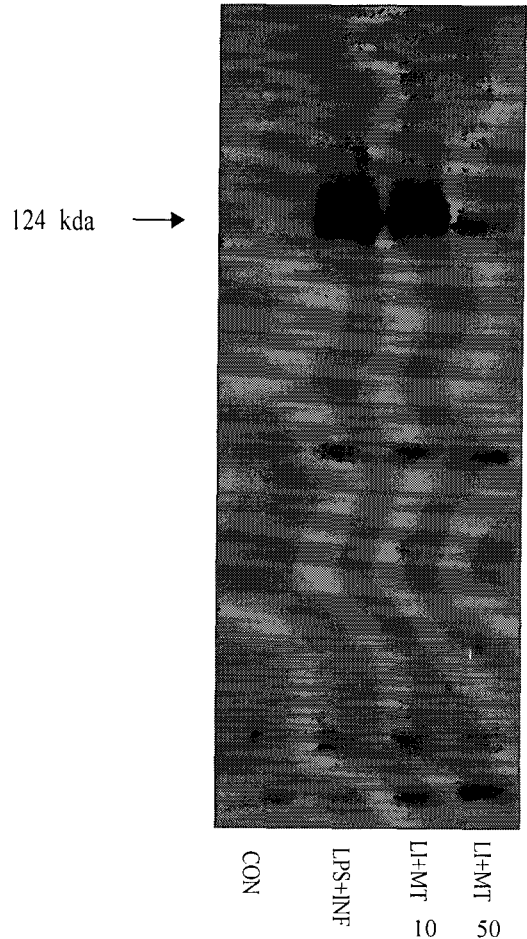


Fig. 7. The effects of Moxi tar on Nitric Oxide synthase in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were cultured in 10cm dishes, cultured for 24h from drugs treatment time with 10% FBS serum RPMI in 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. CON was control. LPS+INF was LPS 1 $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml. LI+MT 10 was LPS 1  $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10  $\mu$ g/ml. LI+MT 50 was LPS 1 $\mu$ g/ml + INF-gamma 20unit/ml + Moxi tar 10  $\mu$ g/ml.

이전의 모습을 보여준 것으로, 동글고 작은 모양을 보이며, 배지액을 흔들면 가늘게 흔들리는 부드럽게 부착된 양상을 보인다. Fig. 10-b는 LPS+INF-gamma에 의한 활성화 모양으로 가늘고 좁은 폭으로 발전된 양상이며, 부착력 역시 배지면과 단단히 부착되어 있다. Fig. 10-c는 灸津 50 $\mu$  g/ml로 자극하였을 경

우에 나타나는 양상이다. Fig. 10-b에 비하여 control群과 많이 비슷한 모습이다. Fig. 10-d는 灸津 100 $\mu$  g/ml로 자극하여 24시간이 경과한 후 나타난 양상이며, 설명하면, Fig. 10-b에 비하여 폭이 넓고, 다소 둥근 모양을 보인다. 免疫細胞의 활성화는 특정 단백질을 생성하기 위한 단계로 미루어 본다면, 灸津에 의한 자극은 LPS+INF-gamma에 의한 활성화와는 다른 활성화를 보이고 있다(Fig. 8).

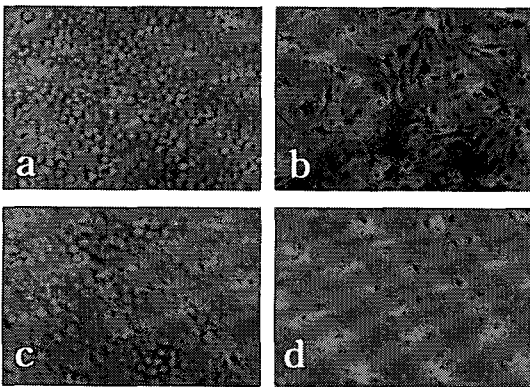


Fig. 8. Activated cell morphology in RAW 264.7 cell by drugs treatment  
a was the control group, b was the LPS 1  $\mu$ g/ml + INF-gamma, c was the Moxi tar 50 $\mu$ g/ml and d was the Moxi tar 100 $\mu$ g/ml treatment.

#### IV. 考 察

調理氣血, 逐寒濕, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 等の 症狀에 하나의 治療<sup>4),5)</sup> 목적으로 응용되던 애구법은 뜸쑥 혹은 애엽(艾葉 Folium Artemisiae Lavandulaefolia)이라 불리는 菊花科(Compositae)에 속한 多年生 草本인 참쑥(Artemisia lavandulaefolia DC.) 및 황해쑥(Artemisia argyi. Lev. et Vant.)과 野艾(A. vulgaris L.)의 잎을 건조<sup>1)</sup>하여 만든 艾灸를 艾絨을 만들어 병증에 상응한 부위에 부착하고 燃燒시킴으로써 얻어지는 온열자극과 연소과정에서 발생하는 물질에 의한 화학적 자극, 두 자극이 미치는 穴位에 대한 자극으로 병

을 치료하는 刺戟療法을 말한다<sup>2)</sup>. 素問<sup>3)</sup> 異法方宜論의 “北方者 天地之所閉藏之域也 其地高陵居 風寒冰冽 其民藥野處而乳食 藏寒生滿病 其治宜艾炷 故艾炷者 亦從北方來”에서 그 起源을 찾아볼 수 있다.

또한 시술방법에 있어 몇가지 원칙이 있는데, 첫째 인체의 部位, 疾病의 淺深, 輕重에 따라 灸의 壯數를 달리 하였으며<sup>15)</sup>, 둘째 인체의 部位, 疾病의 輕重에 따라 艾炷의 크기를 달리 시술하였다. 즉, 頭部, 四肢, 胸部는 小炷로 하였으며, 腹部, 背部는 大炷로 시술하였다<sup>16)</sup>.

그러나, 역대 의가들이 제시한 艾灸의 壯數多小의 기준은 기본적인 원칙만이 제시되었고, 의가들이 주장한 내용도 일치하지 않아, 현재 임상에서 사용할 수 있는 정확한 시술방법을 제시한 것은 아니었다<sup>17)</sup>. 醫學入門<sup>18)</sup>에서는 虛實症狀에 따른 補瀉와 寒熱에 따른 施灸의 方法을 기술하였다. 역대 의가들이 제시한 灸의 補瀉法이란 艾絨에 바람을 불어 빨리태우는 것과 艾絨이 다 타들어 갈때쯤 按壓하여 눌러 끄는 것은 補法이며 그렇지 않은 것은 瀉法이라 하였으나, 그 방법을 제시하지 않은 醫書도 많아 과연 그러할 것인가에 대한 의구심은 여전히 남아있게 되었다.

이렇듯 시술방법이 다소 모호한 艾灸法에 대하여, 최근에 객관적인 시술방법과 그 효능에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러한 연구는 초반에 穴位를 중심으로 하여 온열자극과 艾絨의 연소생성물의 화학적 자극이 혼재된 보고가 일반적이었으나, 점차 온열자극과 화학적 자극을 분리하여 연구된 보고로 변해가는 양상을 보이고 있다.

穴位를 중심으로 한 연구로 施灸順序의 方法을 強調한 孫<sup>19)</sup>의 보고, 艾灸는 施術量에 따라 作用이 相異함을 發見하여 艾灸의 有效用量을 究明한 金<sup>20)</sup>의 보고, 艾灸의 效能은 穴位에 따라 다르며 治療穴의 選定은 매우 重要하다고 주장한 李<sup>21)</sup>의 보고가 있다. 溫熱刺戟에 대한 연구로 林<sup>10-11)</sup>은 溫熱刺戟이 국소조직에 대하여 열분해물질을 생성하여 치료효과를 나타낸다고 보고하였고, 華<sup>12)</sup>는 溫熱의 弱刺戟은 補



의 作用을 일으키고 强刺戟은 瀉의 作用을 일으킨다고 보고하였다. 그리고, 朴<sup>22-23)</sup> 등은 溫熱刺戟 자체만을 분석하였는데, 艾葉을 가열할 때 발생하는 열자극을 객관화하려는 특이한 시도를 했다. 즉 艾葉을 인체에 가해지는 하나의 열자극으로 규정되고 가열되는 艾葉이 시간에 따라 일정한 형태의 열자극적 특징을 나타냄과 아울러, 艾灸의 形態, 大小에 따라서 각기 다른 특징을 나타냄을 보고했으며, 이는 金<sup>20)</sup>이 보고한 艾灸의 施術量에 따라 作用이 相異하다는 것과 일맥상통하다고 볼 수 있다. 艾炷의 연소 과정은 중량에 관계없이 예열기, 가열기, 보온기, 냉각기로 구성되며 동일한 열량의 艾炷라 하더라도 燃燒溫度의 高低, 昇溫速度, 燃燒時間에 따라 刺戟의 樣相 및 刺戟의 質은 相異하게 나타난다고 하였다. 화학적 자극에 대한 연구로 西谷郁子は 艾絨의 燃燒生成物만을 이용해 疣贅치험의 증례를 보고하였고<sup>13)</sup>, 또 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 酸化지질을 저하하는 작용은 艾灸의 열작용이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 보고하였다<sup>14)</sup>.

NO가 처음으로 뇌에서 형성되고, intracellular messenger로서 작용한다는 보고는 1988년 Garthwaite 등에 의해서 알려졌으며, 이들은 glutamate에 의해서 야기되는 NMDA(N-methyl-D-aspartate) receptors가 cyclic GMP 형성과 NO의 분비를 촉진한다고 하였다<sup>24-27)</sup>. NO의 특성인 짧은 반감기(3-5sec)와 신속한 확산성으로 인하여 secretory vesicles에 저장되지 않고 바로 target cell에 작용되어 국부작용을 가져올 수 있다. 또한 높은 전도성으로 neuromodulatory role이 있으며, 이는 electrical current가 관여하는 calcium-dependent mechanism에 의한 것이며, calcium은 glutamate과 NMDA receptor를 통한 세포외 자극과 NO 생성에 관여하는 세포내 자극에 연결되어진다. 신경세포에서 NO가 glutamate neurotoxicity를 매개한다는 보고<sup>28)</sup>와 NO synthase를 가지고 있는 신경세포는 퇴행성변화에 저항성이 있으며, 또한 glutamate neurotoxicity에 저항성을 가

지고 있다는 보고<sup>29)</sup>로 NO의 양면적 작용을 알 수 있다. 또 하나의 중요한 작용은 NO가 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)<sup>7,30-32)</sup>이라는 사실이며 이러한 NO의 작용은 L-arginine의 N<sup>G</sup>-substituted analogs의 발견으로 더욱 구체화되었는데, N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine은 N<sup>G</sup>-methyl-, N<sup>G</sup>-nitro-, N<sup>G</sup>-amino-L-arginine의 analogs에 의해 차단되어지는 메카니즘에 의하여 vascular smooth muscle relaxation을 야기하며<sup>33)</sup>, N<sup>G</sup>-methyl-, N<sup>G</sup>-nitro-, N<sup>G</sup>-amino-L-arginine의 analogs는 endothelium-derived NO의 생성을 저해하며 이는 cyclic GMP와 관련이 있다고 하였다<sup>34-35)</sup>.

1987년 Hibbs<sup>36)</sup> 등은 L-arginine dependent biochemical pathway가 nitrite과 L-citrulline의 생합성을 포함하고 있고, 이는 N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine에 의해서 차단되어진다고 설명하였다. Iyengar<sup>37)</sup> 등은 macrophages에서 nitrite, nitrate, N-nitrosylated amine의 합성에 L-arginine이 필수적이라고 보고하였고, 이러한 관찰로서 vascular endothelial cell에서도 NO의 합성에 L-arginine이 필수적이고, 또한 N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine에 의해서 차단되어진다고 Palmer<sup>38-39)</sup> 등은 보고하였다.

NO 합성의 특징에 대한 연구는 glutamate이 연관된 cyclic GMP formation의 연구로 진행되었다. Glutamate은 excitatory neurotransmitter로 알려져 있고, 주로 ion channels, inositol metabolism, cyclic GMP의 형성에 작용이 있다. Glutamate과 excitatory amino acids는 L-arginine이 NO와 L-citrulline으로 변하는 작용을 활성화하고<sup>40)</sup>, rat의 cerebellum으로부터 cytosolic no synthase를 분리 정제하였다<sup>41)</sup>. 이러한 NO synthase는 NADPH, calcium and calmodulin에 의존적이었고, monomer가 150 kda로 관찰되었다 (Fig. 7).

NO synthase의 종류에는 크게 cytosolic isoform과 membrane-bound isoform 두가지

로 분류된다. 기능에 따라 constitutive isoform과 inducible isoform으로 불리우기도 한다. Constitutive isoform은 catalytically active form으로 존재하며, 접근되는 특별한 chemical에 의해서만 자극되어지며, NO와 L-citrulline의 형성을 매개한다. Constitutive NO synthase는 활성화를 위해서 calcium과 calmodulin을 필요로 하며, 그러므로 calmodulin의 존재하에, intracellular free calcium의 증가는 NO의 생성을 증가시킨다. 이러한 관점은 vascula tissue에서 EDRF나 NO를 통한 혈관확장효과를 야기하는 모든 endothelium-dependent vasodilators는 모두 calcium을 필요로 한다<sup>42-44</sup>. 반면에 inducible NO synthase는 enzymatic activity가 거의 없으며, calcium과 calmodulin을 필요로 하지 않는다. 다만, inducible form은 lipopolysaccharide와 각종의 cytokines, 그와 연관된 chemical substances에 의해서 활성화된다.

본 실험에서 사용되어진 LPS는 bacterial

products로 중추신경계에서 TNF-alpha 신호 전달체계를 활성화시키는 염증유발제<sup>45</sup>)로 잘 알려져 있다. 또한, 동물에 各種의 實驗的 自家免疫病을 誘發하는 物質<sup>46</sup>)로, 大食細胞를 刺戟하여 IL-1의 분비를 誘發하여 T 淋巴球反應을 促進시키고<sup>46-47</sup>), PGE2 (prostaglandin E2)의 생성도 증가시켜서<sup>47-48</sup>), 關節腔內 주사할 경우 急性關節炎을 유발시키는 물질로 알려져 있다<sup>47,49</sup>). Tumor necrosis factor-alpha(TNF-a)는 炎症反應에서 증가하는데, 이 증가된 TNF-a는 IL-1, INF-gamma, IL-8 등의 다른 cytokine과 더불어 炎症反應을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 이미 柳<sup>50)</sup> 李<sup>51)</sup> 등은 LPS 誘發關節炎에서 藥鍼刺戟 및 藥物投與가 cytokine에 미치는 효과를 보고하였다.

본 연구의 결과, 艾灸의 가열 산화반응후 油狀의 灸津이 검출됨을 확인하였다. 檢출된 灸津을 단독 처리하여서는 NO의 생성에 영향을 미치지 않았으며, LPS와 INF-gamma로 유도되는 병리적 상황하에서의 nitric oxide 생성 저하를 가져옴을 알 수 있었다. 이로 인하여 질병의 확장을 차단할 수 있다고 사료되며, 또한 NO의 감소는 바로 NOS의 감소에 의하여 이루어짐이 fig. 6에 의하여 증명되었다. 이로써 艾灸가 질병을 예방하고 正氣를 補한다는 이론은 NO를 조절하고 그 조절기전은 NOS의 감소로 인함을 실험적으로 증명하였다. 또한 艾灸의 효능이 단순히 穴位에 따른 온열효과만이 아니고 灸津의 성분 중 인체의 피하로 스며들어 갈 수 있는 油藥狀의 灸津에 의하여 이루어짐을 증명하였으며 이로써 灸津의 성분중 인체에 유익한 약물학적 성분이 있음을 추측할 수 있었다. 따라서 灸津의 성분을 규명하기 위한 연구가 계속적으로 진행되어야 하고 이 유효성분이 穴位에 미치는 영향에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 思料된다.

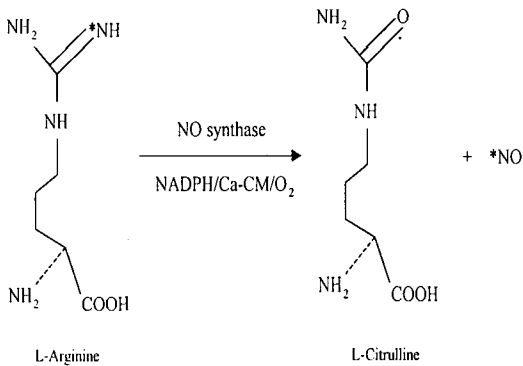


Fig. 9. Schematic illustration of the conversion of L-arginine to NO plus L-citrulline by the enzyme NO synthase. Conversion requires the presence of NADPH, calcium(Ca), calmodulin(CM), and O<sub>2</sub>. Calcium complexes with CM and the Ca-CM complex binds to the enzyme. The asterisk signifies the basic amino nitrogen atom that undergoes oxidation and cleavage to form NO. Both of the basic amino nitrogens are equivalent and either nitrogen can be incorporated into NO.

## V. 結 論

뜸속의 燃燒 後에 추출된 검갈색의 灸津

(Moxi tar)이 免疫細胞에서 유발되는 NO 生成에 미치는 影響에 대한 實驗을 한 후 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 艾灸는 燃燒反應을 거친 후 芳香性·疎水性을 가진 검갈색의 精油成分이 生成되었다.
2. 灸津 자체에 의해서 NO의 生成은 유도되지 않는다.
3. 灸津은 免疫細胞에서 INF-gamma와 LPS로 유도되는 NO의 生成을 억제한다.
4. 灸津과 LPS와 INF-gamma는 免疫細胞를 각기 다른 모양으로 활성화 시킨다.
5. 灸津은 활성화된 免疫細胞에서 iNOS 합성을 억제한다.

이상의 實驗結果, 뜸쑥의 燃燒過程을 통하여 生成되는 少量의 灸津은 iNOS生成 抑制로 인한 NO생성을 감소시키는 작용이 있으며, 艾灸療法의 治療作用은 灸津의 iNOS의 억제로 인한 NO의 감소시키는 機轉에 의한 炎症治療作用이라고 思料된다.

## VI. 參 考 文 獻

1. 신민교. 원색임상본초학. 서울 : 영림사, 1992 : 443-444.
2. 성낙기. 현대침구학. 서울 : 행림출판, 1987 : 56-58.
3. 張志聰, 馬蒔. 黃帝內經, 素問靈樞 張馬合註. 臺北 : 裕昌德書店, 1960 : 100.
4. 전국한의과대학본초학교수공편저. 본초학, 서울 : 영림사 1995 : 405-406.
5. 신편중약대사전, 대북 : 신문출판공사인행, 1970 : 843-847.
6. Feldman, P. L., Griffith, O. W., and Sheuhr. D. J. . The surprising life of nitric oxide. Chem. Eng. News, 1993 : December 20, 26-38.
7. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Wood, K. S. (1988). Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity

- to nitric oxide radical. In "Mechanisms of Vasodilatation" (P. M. Vanhoutte, ed.), pp. 427-435. Raven, New York.
8. J. Garthwaite, Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, Trends Neurosci. 14(1991) 60-67
9. J. Garthwaite, G. Garthwaite, R.M.J, Palmer, S. Mondaca, NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices, Eur. J. Pharmacol. 172(1989) 413-416.
10. 林鍾國, 灸治療의 文獻的 觀察, 동양의학 1976 ; 2권 1호.
11. 林鍾國, 艾灸의 生體反應에 관한 文獻的 考察, 동양의학, 1976 ; 2권 3호.
12. 華延會, 關元俞 등에 대한 刺鍼이 부신피질의 기능에 주는 영향, 중의임상, 1992 ; 4 : 88.
13. 西谷郁子, 灸およびモグサシ 燃燒生成物による 疣贅治療2症例報告, 全日本灸學會雜誌, 1987 ; 37卷 3號.
14. 西谷郁子 植田伸夫, 艾의 燃燒生成物に含まれる 抗酸化作用物質について, 全日本灸學會雜誌, 1988 ; 38卷 1號.
15. 王執中, 鍼灸資生經, 서울 : 一中社, 1991 : 6.
16. 吳亦鼎, 神灸經論, 中國合肥 : 安徽科學技術出版社, 1992 : 61.
17. 趙命來, 艾炷의 刺戟量에 관한 文獻的 考察, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 1997 ; 5(2) : 333-342.
18. 李 挺, 國譯編註醫學入門, 서울 : 崇文社(重刊), 1974 : 885.
19. 손인철 이호섭 배문홍, 관원혈 애구 및 Laser 광선침 자극이 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압에 미치는 영향, 원광한의대 논문집 1983 ; 1집 : 203-218
20. 金庚植, 애구의 용량이 혈청중산소활성에 미치는 영향, 동양의학 1980 ; 6 :

- 20-26.
21. 이준무, 애구가 실험적 고혈압 백서의 혈압, 혈장 renin 활성도 및 catecholamine 농도에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1986.
  22. 박영배, 강성길, 김갑성, 안창범, 오환섭, 허웅, 애구의 연소특성에 관한 실험적 연구(I), 서울, 대한한의학회지 1993; 14(1) : 167-177.
  23. 박영배, 강성길, 김창환, 고동균, 오환섭, 허웅, 애주의 형태별 연소특성에 대한 연구, 서울, 대한한의학회지 1995; 16(1) : 370-378.
  24. Feldman, P. L., Griffith, O. W., and Sheuhr. D. J. (1993). The surprising life of nitric oxide. Chem. Eng. News. December 20, 26-38.
  25. Gally, J. A., Montague, P. R., Reeke, G. N., Jr., and Edelman, G. M. (1990). The NO hypothesis; Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 87, 3547-3551.
  26. Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide; Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43, 109-142.
  27. Garthwaite, J., Charles, S. L., and Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature(London) 336, 385-388.
  28. Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Brecht, D. S., and Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 6368-6371.
  29. Koh, J. Y., and Choi, D. W. (1988). Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins; Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J.Neurosci. 8, 2153-2163.
  30. Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. and Kadowitz, P. J. (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein; Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237, 893-900.
  31. Ignarro, L. J., Wood, K. S., Ballot, B., and Wolin, M. S. (1984). Guanylate cyclase from bovine lung; Evidence that enzyme activation by phenylhydrazine is mediated by ironphenyl hemoprotein complexes. J. Biol. Chem. 259, 5923-5931.
  32. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., and Wood, K. S.(1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. Circ. Res. 61, 866-879.
  33. Wallace, G. C., Gulati, P., and Fukuto, J. M., (1991). N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-arginine; A novel arginine analog capable of causing vasorelaxation in bovine intrapulmonary artery. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 528-534.
  34. Gole, M. E., Wood, K. S., Byrns, R. E., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1990). N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine causes endothelium-dependent contraction and inhibition of cyclic GMP formation in artery and vein. Proc. Natl.

- Acad. Sci. U.S.A. 87, 4430-4434.
35. Fukuto, J. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Ignarro, L. J. (1990). N<sup>G</sup>-amino-L-arginine ;A new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 458-465.
  36. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., and Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity; Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473-476.
  37. Iyengar, R., Stuehr, D. J., and Marletta, M. A. (1987). Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines; Precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6369-6378.
  38. Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature(London)* 333, 664-666.
  39. Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251-1256.
  40. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9030-9033.
  41. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 682-685.
  42. Singer, H. A., and Peach, M. J. (1982). Calcium and endothelium mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension (Dallas)* 4, 19-25
  43. Singer, H. A., and Peach, M. J. (1983). Endothelium dependent relaxation of rabbit aorta. I. Relaxation stimulated by arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 790-795.
  44. Long, C. J., and Stone, T. W. (1985). The release of endothelium-derived relaxing factor is calcium-dependent. *Blood Vessels* 22, 205-208.
  45. A. Matsukawa, S. Ohkawara, T. Maeda, K. Takagi, M. Yoshinaga : Production of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$  receptor antagonist and pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits, *Clin. Exp. Immunol.*, 93 : 206-211, 1993.
  46. Garthwaite, J., Chales, S.L., Chess-Williams, R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain, *Nature*, 336, 385-387.
  47. Vincent, S.R. 1994. Nitric oxide : a radical neurotransmitter in the central nervous system, *Progr. Neurobiol.*, 42, 129-160.
  48. Sato, S., Tominaga, T., Ohnishi, S.T. 1993. EPR spin-trapping study of nitric-oxide formation during bilateral carotid occlusion in the rat, *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 195-197
  49. Tominaga, T., Sato, S., Ohnishi, S.T. 1993. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral-ischemia in the rat. In vivo detection of nitric oxide radical by electron-paramagnetic-resonance spin trapping, *Brain Res.*

614, 342-346.

50. 류경주, 신현대, 정석희, 이종수, 김성수.,  
白虎湯과 白虎加桂枝湯이 류마토이드 관  
절염 및 Human monocyte의 IL-8에 미  
치는 영향, 서울, 한방물리요법과학회지  
1995; 5(1) : 79-100

51. 이충원, 이종수, 정석희, 김성수, 신현대.,  
並祛湯이 류마토이드 관절염 및 Human  
Monocyte의 IL-8에 미치는 영향, 서울,  
한방물리요법과학회지 1995; 5(1) :  
131-148