

원 저

Lipopolysaccharide에 의해 유발된 발열에 있어서 升麻의 해열효과

권일호, 김남권, 강학천, 임홍진, 김진만
원광대학교 한의과대학 외관과학교실

Antipyretic Effect of *Rhizoma Cimicifugae* in a Rat Model of LPS-Induced Fever

Il-Ho Kwon, Nam-Kwon Kim, Hsueh-Chuan Chiang, Hong-Jin Lim, Jin-Man Kim

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Oriental Medical College, Wonkwang University

Objective: In this study, we investigated the effects of *Rhizoma Cimicifugae* (RC) on the induction of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 murine macrophages treated with lipopolysaccharide (LPS).

Methods: We examined whether RC have an antipyretic effect by inhibition of COX and/or NOS in fever that is evoked by an intraperitoneal injection of LPS in rats.

Results:

1. RC inhibited NO metabolites produced by activated murine macrophage in a dose-dependent manner.
2. RC had an antipyretic effect in a dose-dependent manner in LPS-induced fever.
3. RC inhibited levels of both COX-2 protein and iNOS protein increased by the treatment of LPS in brain tissues as well as brain blood vessels.
4. There were no changes in proteins of nNOS/COX-1.

Conclusions: RC has an antipyretic effect by attenuating the level of iNOS and COX-2 protein. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):32-44)

Key Words: antipyretic effect, *Rhizoma Cimicifugae*, lipopolysaccharide

서 론

인체 내에서의 열 생산은 근육의 운동, 음식물의 동화작용과 기초대사율에 기여하는 모든 생체활동과정에서 이루어지며, 열 손실은 방열, 전도, 피부와 기도에서의 수분증발작용 등에 의해 이루어진다. 인체의 기능이 정상적으로 유지되기 위해서는 일정한 체

온이 요구되며, 여러 가지 병적인 원인으로 인하여 체온 조절 중추에 변조가 일어나게 되면 발열현상 등과 같은 이상상태가 발생하게 된다^{1,2)}.

한의학에서는 발열현상을 火, 熱 등으로 표현하였고 六氣 가운데 暑, 火는 물론이고 風, 寒, 燥, 濕도 모두 火와 熱로 변화할 수 있다고 하였으며, 火와 熱로 변하는 까닭은 六淫의 邪가 인체의 생리적인 陰陽의 작용을 鬱滯, 沮止, 閉塞시키므로써 火와 熱로 변화한다고 하였다³⁾.

의학의 시조인 히포크라테스의 시대부터 잘 알려져 있는 바와 같이, 발열은 여러 형태의 감염이나 염

· 접수 : 2002년 6월 28일 · 채택 : 2002년 9월 12일
· 교신저자 : 권일호 (Tel. 02-992-1075, Fax : 02-992-1121, E-mail : kih0015@hanmail.net) 서울 도봉구 쌍문2동 41-1호

증에 동반되는 일반적인 증상이다^{4,5)}.

실험실에서 흔히 쓰이는 Lipopolysaccharide(LPS)나 사이토카인과 같은 염증성 자극에 인체가 반응하면 일련의 병리적인 반응들이 발생한다⁶⁾. 이 과정에서 사이클로옥시게나제-2(COX-2)와 산화질소 신테이스(NOS)는 유발된 발열에서 매우 중요한 역할을 하고 있다⁸⁾.

한의학에서 이러한 발열현상의 치료는 약물요법과 침구요법 등이 응용되어져 왔으며, 최근에는 질병치료의 목적으로 전래의 약물요법과 침구요법 외에 Laser 침요법^{9,10)}등의 신침요법이 개발되어 왔다.

승마(Rhizoma Cimicifugae)는 통증과 염증 및 발열 질환을 치료하기 위해 전통적으로 사용하여 온 한약재 중 하나로서, 동물실험에서¹¹⁾ 항염작용이 있다는 보고 외에 승마의 화학적 구성성분에 대해서도 연구 발표된 한약재이다¹²⁾.

본 논문의 주된 논점은 1) 승마가 RAW 264.7 대식 세포에 LPS를 처리하여 발생한 NO에 대해 어떠한 작용을 나타내는지 2) 승마가 LPS 유도성 발열에 대해 어떠한 효과를 나타내는지 3) 승마의 해열작용은 COX-1/COX-2 및 inducible NOS/neuronal NOS와 어떤 관련이 있는가이다.

본 논문에서는 이러한 논점을 밝히므로써 LPS 유도성 발열에 대한 승마의 항염증작용을 규명하였으며, 더 나아가 LPS 유도성 발열모델에서 밝혀진 승마의 해열기전을 통해 복막염이나 중추성 염증, 및 관절염 모델 등 다른 염증모델에 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley (4주령, 130-150g)가 사용되었으며, 원광대학교 한의학전문대학원에서 사육되었다. 동물은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 의 조건에서 한 케이지에 4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이

러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 시약 및 재료

RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다. Escherichia coli인 LPS(O111 : B4), 단백질정량을 위한 Bradford reagent, Sodium bicarbonate, Antibiotic mixture, Nitrate Reductase (NAD[P]H), β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced form(β -NADH), MOPS buffer는 Sigma(St. Louis, MO)에서, nNOS antibody와 iNOS antibody는 Transduction Laboratories에서, COX-1 monoclonal antibody와 COX-2 (murine) polyclonal antibody는 Cayman Chemical에서, Anti-mouse IgG와 Anti-rabbit IgG와 HybondTM-c(nitrocellulose membrane)는 Amersham pharmacia biotech에서, Prestained SDS-PAGE standards(Broad range)는 Bio-Rad Laboratories에서, RPMI Medium 1640, Fetal bovine serum, Trypsin EDTA는 Gibco에서 구입하였다.

3. 약재 추출

약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다. 승마 180g을 물 1800ml과 함께 환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 2시간동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 52°C 에서 진공농축으로 감압농축시켜 -70°C 에서 24시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결건조하여 20.32g의 분말시료를 얻었다.

4. 복강온도 측정

Telemetry system(Mini-Mitter, Sunriver, OR)을 이용하여 동물이 의식이 있는 상태에서 복강온도를 측정하였다. 적어도 실험하기 일주일 전에 동물의 복강 체온에 상응하는 주파수를 방출하는 Temperature transmitter(model VM-HF 3000)를 케타민 마취상태

에서 각 동물의 복강에 삽입하였다. Transmitter로부터 나오는 신호는 각 동물의 케이지 밑에 놓여진 Receiver에 의해 탐지되었다. 체온은 매 10분마다 측정되었다. 실험은 동물을 12시간 주기로 주야를 바꿔서 사육하지 않았기 때문에 동물이 활동하기 시작하는 18시부터 실험을 시작하였으며, LPS 주입 전 예비 체온 측정은 19시부터 1시간동안 측정한 후 20시에 LPS(50 μ g/kg, i.p. 0.5 ml)를 복강내 투여하여 20시부터 다음날 08시까지 12시간동안 체온변화를 관찰하였다. 데이터는 LPS를 주입하기 직전의 온도를 '0'으로 보정하여 표현하였다.

5. 세포배양법(RAW 264.7 macrophage cell culture)

RAW 264.7 세포는 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 15% horse serum, 2% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, antibiotics를 포함하는 RPMI-1640로 배양하였다. 배지는 1주일에 2번정도 80%를 교체하였다. 세포는 10cm² dish를 사용하여 배양하였다.

6. NO 정량(in vitro)

NO 측정실험을 할 때에는 RAW 264.7 세포들은 phenol red가 없는 RPMI를 사용하여 배양하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 medium에서 nitrite를 분석하기 위해 spectrophotometric determination 하는 Griess 시약 검정법을 사용하였다. 간단히 말하면, 각 샘플 40 μ l와 MOPS buffer(50mM MOPS/1mM EDTA, pH 7.0) 45 μ l를 혼합하고 reconstituted Nitrate reductase(500 μ l MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5 μ l를 가한 후 2mM NADH 10 μ l를 가하여 20분동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 50 μ l Griess reagent A(1% sulfanilamide in 3N HCl)와 짧게 반응시키고, 50 μ l Griess reagent B(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2HCl)과 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, Microtiter plate reader를 이용하여 540nm에서 흡수율을 측정하였다. Nitrite 농도의 표준곡선은 NaNO₃로부터 계산되었다.

7. Western blot 분석

1) 혈관이 풍부한 뇌 샘플에서 COX-1/COX-2, iNOS/nNOS 분석

Western blot analysis를 위해 아무 처치도 하지 않은 정상 쥐들, LPS가 처치된 쥐들, LPS와 승마를 함께 처치한 쥐들로부터 뇌혈관이 풍부한 샘플을 준비하였다. 동물들에게 LPS 주입 후 4시간 50분 후에 diethyl- ether 마취상태에서 단두하여 빠르게 뇌를 제거한 후에 액화질소에 얼려 사용할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관한다. 각 뇌조직은 Homogenization buffer에 담아 놓은 후 Teflon homogenizer로 균질화한다. 균질화된 조직은 PBS(20mM, pH 7.4)를 충분히 사용하여 nylon mesh(mesh size=180 μ m)로 2번 여과한다. Nylon mesh로 걸어진 잔유물은 뇌혈관이 매우 풍부한 샘플이다. 이 샘플들은 Sonicator로 더욱 균질화한 후, 사용할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관한다. 단백질량은 bradford 법을 사용하였다. 이 샘플들은 5 \times concentrated SDS sample buffer(1 \times 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol, 0.003% bromophenol, 1% β -mercaptoethanol)와 섞어서 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후 10,000 rpm에서 5-10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel(COX-1, COX-2, nNOS는 7.5% gradient 사용, iNOS는 10% gradient 사용)에 걸어서 electrophoresis를 한다. 그리고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer시킨다. Membrane은 실온에서 blocking buffer(TBS-T에 5% skim milk)에 blocking을 하고, anti-COX-1, anti-COX-2, anti-iNOS, anti-nNOS antibody를 1:1000으로 하여 1시간동안 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase- conjugated secondary antibody(Anti-mouse IgG 또는 Anti-rabbit IgG)와 2시간동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) developing kit를 사용하여 발색, 감광시킨다.

8. 통계처리(Statistical analysis)

데이터는 Mean \pm SEM으로 나타냈다. 발열에 대한

Time Course는 One Way ANOVA를 사용하였고, NO 정량 및 Densitometer를 이용한 Protein band 분석은 student t-test를 이용하여 유의성 검사를 하였다.

실험성적

1. Murine macrophage에서 LPS에 의해 증가된 NO에 미치는 승마의 효과

RAW 264.7 murine macrophage에 LPS를 처리하여 증가된 NO에 대한 승마 물추출물의 효과를 알아보기 위하여 실험하였다. LPS 처치 2시간전에 승마를 전처치한 후, LPS 단독처리 대조군과 함께 24시간동안 반응시켰다. LPS 농도는 1 μ g/ml, 승마 물추출물의 농도는 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml이다. 실험결과, LPS 단독처리군은 유의성있게 NO가 증가되었다. 승마 처리군에서 1 μ g/ml을 처치하였을 때는 유의성있는 변화가 나타나지 않았으나, 10 μ g/ml 농도 이상 처리하였을 때는 유의성있는 NO 억제효과를 보여주었다.

이러한 결과들로부터 LPS에 의해 자극된 RAW

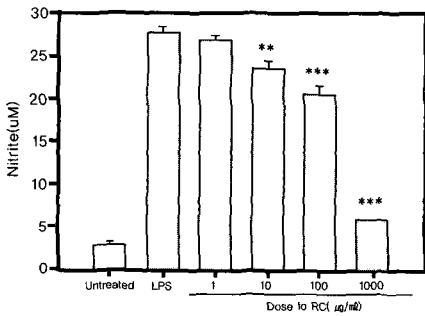


Fig. 1. Effect of *Rhizoma Cimicifugae* on NO produced by activated murine macrophages. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS(1 μ g/ml) and pretreated or not with increasing concentration (1, 10, 100, and 1000 μ g/ml) of HP for 24h. The cells of *Rhizoma Cimicifugae*-pretreated group were pretreated with *Rhizoma Cimicifugae* for 2h and incubated with LPS for 24h. The nitrite production was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. The data are expressed as means \pm SEM of five determinations. ** p<0.005, *** p<0.001, compared with the LPS-treated group.

264.7 세포에 대해 승마는 NO 억제효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.(Fig. 1)

2. LPS 투여 후 복강내 온도 변화

동물에게 LPS(50 μ g/kg, i.p. 0.5ml)를 주입한 후 발생한 발열 경향을 알아보기 위하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 멸균된 생리식염수를 주입한 동물과 아무 처치도 하지 않은 동물의 체온을 대조군으로 하였다. LPS나 식염수가 주입된 동물들은 두 그룹 모두 주입하자마자 즉각적으로 복강내 온도(<0.6 $^{\circ}$ C)가 약간 증가하였다. 이 증가는 주입에 의한 스트레스에 기인한 것 같다. 그러나 LPS가 주입된 동물들은 주입 후 1시간부터 다시 증가하기 시작하여 5시간째 최대로 증가하였다가 점차 감소하는 전형적인 LPS 유도성 발열을 보여주었다. 이 LPS성 발열은 이상성 체온변화를 보여주었는데, 첫 번째 변화는 LPS 주입 후 2시간 20분째로 1.17 $^{\circ}$ C까지 상승하였다가 감소하였으며, 두 번째 변화는 5시간째로 1.3 $^{\circ}$ C까지 상승하였다가 점차 감소하기 시작하였다. 식염수가 주입된 쥐들은 주입 후 잠시 온도가 상승하였다가 1시간부터 아무 처치도 하지 않은 쥐들의 circadian rhythm과 비슷한 변화를 보여주었다.(Fig. 2)

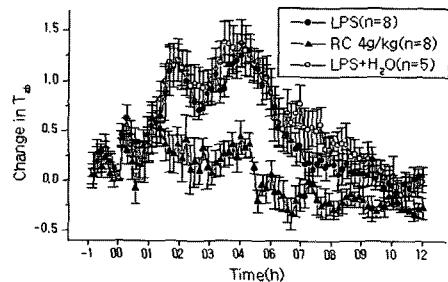


Fig. 2. Change on abdominal temperature(Tab) of LPS-treated rats(squares, n=8), normal saline-treated rats(circles, n=6), and untreated rats(triangles, n=6). Animals were injected with LPS(50 μ g/kg, i.p. 0.5ml) or normal saline(0.5ml, i.p.). All of the injections were made between 20:00 and 20:10 P.M., and the values were expressed as the difference from the preinjection level. The time of injection was set to 0 on the x-axis.

3. LPS로 유발된 발열에 대한 승마의 효과

LPS로 유발된 발열에서 승마 물추출물의 해열효과를 입증하기 위하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. LPS 투여군과 LPS와 물 투여군 두 그룹의 체온변화를 대조군으로 하였다. 각 동물간의 처치 전 기초체온에는 별다른 차이가 없었다. 승마 물추출물 4g/kg(400mg/ml, 쥐 200g당 1ml의 비율로 2회 투여)과 물(1ml)은 LPS를 주입하는 시간과 그 후 1시간째에 각각 투여하여 총 2번 투여하였다. 세 실험군 모두 약물을 처치하자마자 즉각적으로 복강내 온도가 약간 증가하였으나, 이 증가는 주입에 의한 스트레스에 기인하는 것 같다. 그러나 LPS나 LPS와 물을 주입한 동물들은 주입 후 1시간부터 다시 체온이 증가하기 시작하여 5시간째에는 최대로 증가하였다가 점차 감소하였다. LPS 투여 즉시 구강으로 승마 추출물을 투여한 동물들은 첫 번째 최고 발열기인 2시간 20분째에 0.34℃정도 상승하였다가 점차 감소하였으며, 이는 LPS와 물을 함께 투여한 동물의 체온보다 0.8℃정도 감소된 것이다. 또한 두 번째 최고 발열기

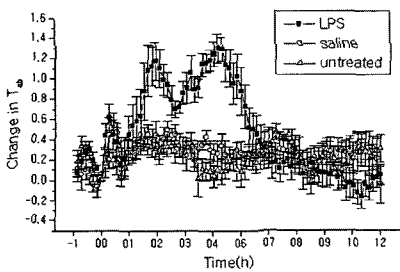


Fig. 3. Change in abdominal temperature(T_{ab}) of LPS-treated rats(circles), LPS & water-cotreated rats(triangles), and LPS & Rhizoma Cimicifugae-cotreated rats(squares). All animals were intraperitoneally injected with LPS. LPS-treated animals were orally injected with or without Rhizoma Cimicifugae(4g/kg, 400mg/ml, 1ml/200g rat, 2 times treatment) and water(1ml, 2 times treatment). All of the injections were made between 20:00 and 21:00 P.M. and the values were expressed as the difference from the preinjection level. The time of injection was set to 0 on the x-axis.

인 5시간째에는 첫 번째 발열기 이후 계속 감소하여 0.3℃정도까지 감소되어 있었으며, 이는 LPS와 물 투여군보다 1.0℃정도 감소된 것이다. 또한 투여 후 7시간부터 12시간 사이에 부분적으로 체온현상이 나타났다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열에서 승마 물추출물은 해열효과를 나타냄을 알 수 있었다.(Fig. 3)

4. LPS로 유발된 발열에서 승마의 농도 의존적인 효과

LPS로 유발된 발열에 대한 승마 물추출물의 해열효과를 여러 농도에서 실험하였다. LPS성 발열이 이상성 체온 변화를 나타냈기 때문에, 첫 번째 발열 최고시기인 2시간 20분째와 두 번째 발열 최고시기인 5시간째에 각 농도의 체온변화를 측정하였다. 승마는 0.5g/kg(50mg/ml, 1ml/200g rat, 2회 투여), 1g/kg(100mg/ml, 1ml/200g rat, 2회 투여), 2.0g/kg(200mg/ml, 1ml/200g rat, 2회 투여), 4g/kg(400mg/ml, 1ml/200g rat, 2회 투여)의 농도로 투여하였다. 각 동물간 기초체온에는 별다른 차이가 없었다. 승마 물추출물의 투여회수는 LPS 투여시와 투여 후 1시간에 각각 1회씩 투여하여 총 2회 투여하였다. 실험결과, 승마를 2.0g/kg 농도 이상 투여했을 때, LPS 투여 후 2시간 20분째 및 5시간째에 LPS 단독 투여군에 비해 유의성있게 체온증가를 억제시켰다.

이러한 결과들로부터, LPS성 발열에서 승마 물추출물은 농도 의존적으로 해열효과를 나타냄을 알 수 있었다.(Fig. 4)

5. LPS로 유발된 발열에서 L-NAME와 Indomethacin의 효과

LPS로 유발된 발열에서 NO 억제제인 L-NAME와 COX 억제제인 Indomethacin의 해열효과를 알아보기 위하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. Indomethacin은 1.5mg/kg 또는 3mg/kg이 주입하였고, L-NAME는 25mg/kg 또는 50mg/kg을 주입하였다. 각 동물간 처치전 기초체온에는 별다른 차이가 없었다. Indomethacin과 L-NAME 투여는 승마 물추출물과는 달리 LPS 주입할 때 동시에 1번만 투여하

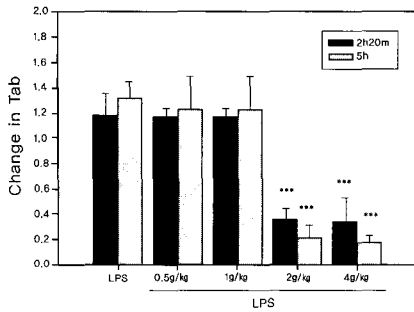


Fig. 4. Change in abdominal temperature(Tab) of LPS-treated rats(n=8), and LPS & Rhizoma Cimicifugae-cotreated rats. All animals were intraperitoneally injected with LPS. LPS-treated animals were orally injected with or without Rhizoma Cimicifugae. Doses of Rhizoma Cimicifugae treated were 0.5g/kg(50mg/ml, 1ml/200g rat, 2 times treatment, n=4), 1g/kg(n=4), 2.0g/kg(n=6), and 4g/kg(n=8). All of the injections were made between 20:00 and 21:00 P.M. and the values were expressed as the difference from the preinjection level. *** p<0.001 compared with LPS-treated control group.

였다. 실험결과, Indomethacin 1.5mg/kg이 투여된 동물은 투여 후 2시간 20분째에 0.6℃ 정도 상승했으며, 5시간째에 온도가 상승했다가(<0.8℃) 감소하기 시작하였다. Indomethacin 3mg./kg이 투여된 동물은 투여 후 실험하는 시간동안 유의성있는 온도상승을 보여주지 않았다. L-NAME 25mg/kg 및 50mg/kg이 투여된 동물은 투여 후 1시간정도 온도가 상승되어 있다가(<0.5℃) 점차 감소하여 실험하는 시간동안 두 농도 모두 유의성있는 온도변화를 보여주지 않았다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열은 NO 및 COX와 관련이 있다는 것을 알 수 있었으며, 승마 물추출물의 해열효과는 LPS 투여 후 2시간째에는 Indomethacin 1.5mg/kg의 효과와 비슷하고, 4시간째에는 Indomethacin 3mg/kg, L-NAME 25mg/kg 농도이상의 효과와 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 또한 승마의 해열효과는 NO계보다는 COX와 더욱 관련이 있음을 추측할 수 있었다.(Fig.5)

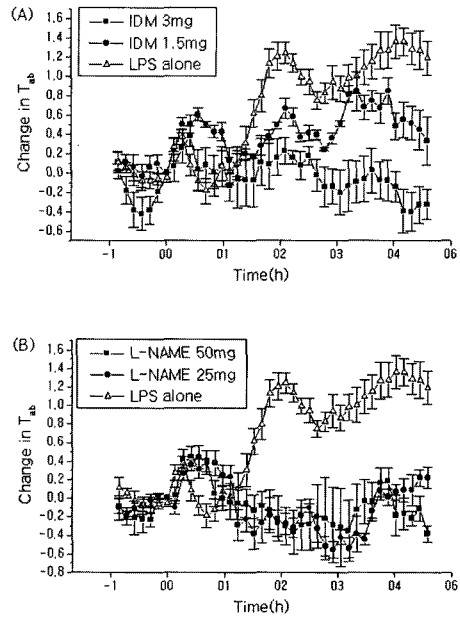


Fig. 5. Change in abdominal temperature(Tab) of LPS-treated rats(8 rats), LPS and IDM-cotreated rats(each 4 rats in each dose), and LPS and L-NAME-cotreated rats(each 4 rats in each dose). Animals were injected with LPS(50µg/kg, i.p. 0.5ml) with or without IDM (1.5mg/kg and 3mg/kg) or L-NAME(25mg/kg and 50mg/kg). All of the injections were made between 20:00 and 20:10 P.M., and the values were expressed as the difference from the preinjection level. The time of injection was set to 0 on the x-axis.

6. 정상 쥐의 체온에 미치는 승마의 효과

LPS가 처치되지 않은 정상 동물들의 체온 변화에 있어서 승마가 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 대조군은 물 투여군으로 하였다. 각 동물간 처치전 기초체온에는 별다른 차이가 없었다. 승마와 물 투여회수는 LPS 주입할 때 1회, LPS 투여 후 1시간째 1회 투여하여 총 2회 투여하였다. 실험결과, 승마 투여군과 물 투여군은 유의성있는 온도변화를 보여주지 않았으며, 두 투여군 간에도 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다.

이러한 결과들로부터 승마는 LPS가 처치되지 않은 동물들의 정상체온에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.(Fig. 6)

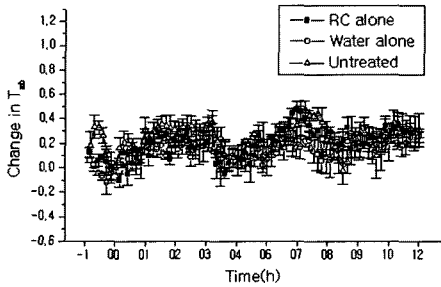


Fig. 6. Change in abdominal temperature(Tab) of Rhizoma Cimicifugae-treated rats(n=6) and water-treated rats(n=6) without the treatment of LPS. Animals were orally injected with Rhizoma Cimicifugae 4g/kg(400mg/ml, 1ml/200g rat, 2 times treatment) or water(1ml, 2 times treatment). All of the injections were made between 20:00 and 21:00 P.M. and the values were expressed as the difference from the preinjection level.

7. LPS성 발열에서 뇌혈관의 COX-1 발현양상 및 승마의 효과

LPS를 주입하고 승마를 구강내로 투여한 후 뇌혈관에서 COX-1을 분석하여 승마가 COX-1에 미치는 영향에 대해 실험하였다. LPS 투여와 동시에 승마 2.5g/kg(250mg/ml, 1ml/200g rat)을 1회 투여하고, 1시간 후에 1회 더 투여하여 총 2회 투여하였다. LPS 투여 후, 4시간 50분째에 단두하여 Western blot analysis를 이용하여 분석하였다. 실험 결과, 아무 처치를 하지 않은 동물들의 뇌혈관과 LPS를 투여한 동물들의 뇌혈관 및 LPS와 승마를 처리한 동물들의 뇌혈관에서 발현된 COX-1 간에는 유의성있는 차이가 나타나지 않았다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열은 COX-1과는 관계가 없으며 승마 또한 COX-1에 대해 아무런 영향을 주지 않았음을 알 수 있는데, 이는 승마의 해열 기전과 뇌혈관내 COX-1은 관계가 없다는 것을 가리키는 것이다.(Fig. 7)

8. LPS성 발열에서 뇌혈관의 COX-2 발현양상 및 승마의 효과

LPS를 주입하고 승마를 구강내로 투여한 후 뇌혈

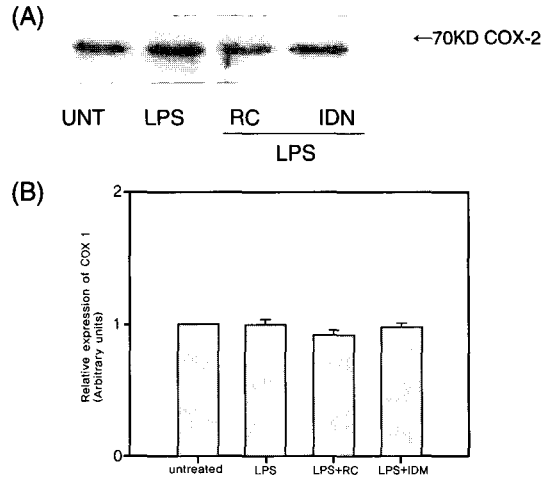


Fig. 7. Effects of LPS and Rhizoma Cimicifugae(or IDM) on COX-1 protein in the blood vessel-enriched brain samples. Rats were stimulated with LPS and were decapitated 5h after the injection of LPS with or without RC or IDM. The blood-vessel-enriched brain samples were prepared by homogenizer, nylon mesh, and sonicator method as described in Methods section. <A> shows western blot analysis of COX-1. A total of 50 μ g of protein was loaded in all the lanes. shows the percent increase or decrease in the COX-1 signal of several samples when compared with that of untreated control samples using a densitometer. Data are expressed as mean \pm SEM. IDM: Indomethacin.

관에서 COX-2를 분석하여 승마가 COX-2에 미치는 영향에 대해 실험하였다. LPS 투여와 동시에 승마 2.5g/kg(250mg/ml, 1ml/200g rat)을 1회 투여하고, 1시간 후에 1회 더 투여하여 총 2회 투여하였다. LPS 투여 후, 4시간 50분째에 단두하여 Western blot analysis를 이용하여 분석하였다. 실험 결과, 아무 처치를 하지 않은 동물들의 뇌혈관에서는 적지만 유의성있는 양이 분석되었다. 그리고 LPS를 투여한 동물들의 뇌혈관에서는 LPS로 인해 COX-2 발현이 상당히 증가되어 있었으며, LPS와 승마를 처리한 동물들의 뇌혈관에서 COX-2는 LPS 투여군에 비해 COX-2가 상당히 억제되어 아무 처치도 하지 않은 동물들의 COX-2 발현양상과 비슷하였다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열에 의해 증가된 뇌혈관내 COX-2에 대해 승마는 유의성 있는 억제효

과를 나타냈으며, 이는 승마가 LPS성 발열에 대해 해열효과를 나타냄을 가리키는 것이다.(Fig. 8)

9. LPS성 발열에서 뇌혈관의 iNOS 발현양상 및 승마의 효과

LPS를 주입하고 승마를 구강내로 투여한 후 뇌혈관에서 iNOS를 분석하여 승마가 iNOS에 미치는 영향에 대해 실험하였다. LPS 투여와 동시에 승마 2.5g/kg(250mg/ml, 1ml/200g rat)을 1회 투여하고, 1시간 후에 1회 더 투여하여 총 2회 투여하였다. LPS 투여 후, 4시간 50분째에 단두하여 Western blot analysis를 이용하여 분석하였다. 실험 결과, 아무 처치를 하지 않은 동물들의 뇌혈관에서는 적지만 유의성 있는 양이 분석되었다. 그리고 LPS를 투여한 동물들의 뇌

혈관에서는 LPS로 인해 iNOS 발현이 증가되어 있었으며, LPS와 승마를 처리한 동물들의 뇌혈관에서 iNOS는 LPS 투여군에 비해 상당히 억제되어 아무 처치도 하지 않은 동물들의 iNOS 발현 양과 비슷하였다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열에 의해 증가된 뇌혈관내 iNOS에 대해 승마는 유의성 있는 억제효과를 나타냈으며, 이는 승마가 LPS성 발열에 대해 해열효과를 나타냄을 가리키는 것이다.(Fig. 9)

10. LPS성 발열에서 뇌혈관의 nNOS 발현양상 및 승마의 효과

LPS를 주입하고 승마를 구강내로 투여한 후 뇌혈관에서 nNOS를 분석하여 승마가 nNOS에 미치는

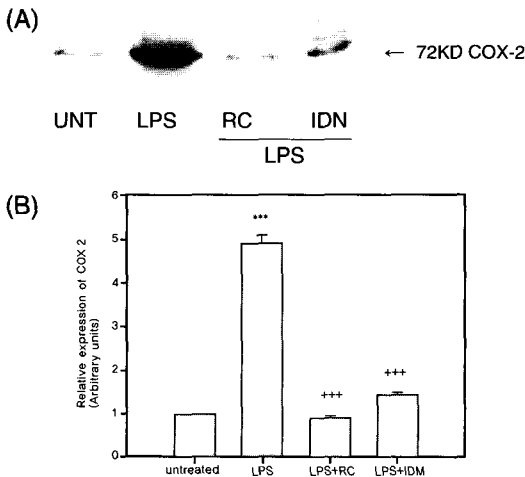


Fig. 8. Effects of LPS and RC(or IDM) on COX-2 protein in the blood vessel-enriched brain samples. Rats were stimulated with LPS and were decapitated 5h after the injection of LPS with or without RC or IDM. The blood-vessel-enriched brain samples were prepared by homogenizer, nylon mesh, and sonicator method as described in Methods section. <A> shows western blot analysis of COX-2. A total of 50 μ g of protein was loaded in all the lanes. shows the percent increase or decrease in the COX-2 signal of several samples when compared with that of untreated control samples using a densitometer. Data are expressed as mean \pm SEM. *** p<0.001 compared with untreated control group. +++ p<0.001 compared with LPS-treated control group. IDM : Indomethacin

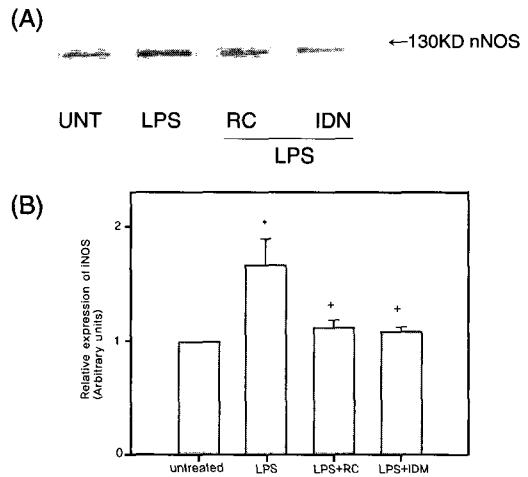


Fig. 9. Effects of LPS and RC(or IDM) on iNOS protein in the blood vessel-enriched brain samples. Rats were stimulated with LPS and were decapitated 5h after the injection of LPS with or without RC. The blood-vessel-enriched brain samples were prepared by homogenizer, nylon mesh, and sonicator method as described in Methods section. <A> shows western blot analysis of iNOS. A total of 50 μ g of protein was loaded in all the lanes. shows the percent increase or decrease in the iNOS signal of several samples when compared with that of untreated control samples using a densitometer. Data are expressed as mean \pm SEM. * p<0.5 compared with untreated control group. + p<0.05 compared with LPS-treated control group. IDM : Indomethacin.

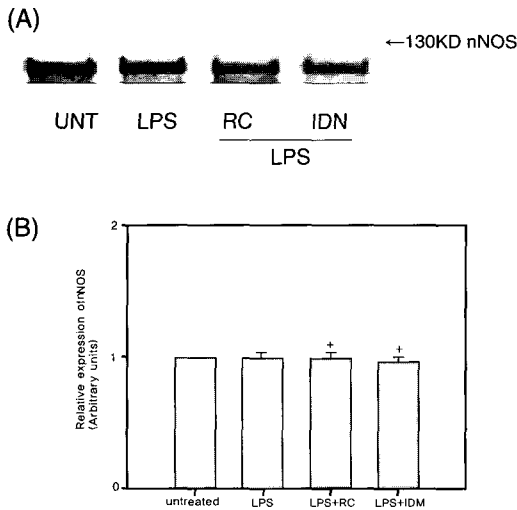


Fig. 10. Effects of LPS and RC(or IDM) on nNOS protein in the blood vessel-enriched brain samples. Rats were stimulated with LPS and were decapitated 5h after the injection of LPS with or without RC or IDM. The blood-vessel-enriched brain samples were prepared by homogenizer, nylon mesh, and sonicator method as described in Methods section. <A> shows western blot analysis of nNOS. A total of 50 μ g of protein was loaded in all the lanes. shows the percent increase or decrease in the nNOS signal of several samples when compared with that of untreated control samples using a densitometer. Data are expressed as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ compared with LPS-treated control group. IDM : Indomethacin.

영향에 대해 실험하였다. LPS 투여와 동시에 승마 2.5g/kg(250mg/ml, 1ml/200g rat)을 1회 투여하고, 1시간 후에 1회 더 투여하여 총 2회 투여하였다. LPS 투여 후, 4시간 50분째에 단두하여 Western blot analysis를 이용하여 분석하였다. 실험 결과, 아무 처치를 하지 않은 동물들의 뇌혈관에서는 유의성 있는 nNOS 양이 분석되었다. 그리고 LPS를 투여한 동물들의 뇌혈관에서는 아무처치도 하지 않은 동물들과 비슷하게 nNOS가 발현되어 있었으며, LPS와 승마를 함께 처리한 동물들의 뇌혈관에서 nNOS는 LPS 투여군에 비해 상당히 억제되어 있었다.

이러한 결과들로부터 LPS성 발열과 nNOS는 관련

이 없으나 승마는 nNOS를 유의성 있게 억제시켰으며, 이는 승마의 해열효과가 뇌혈관의 nNOS와 관련이 있음을 시사하는 것이다.(Fig. 10)

고 찰

인체내에서의 열생산은 근육의 운동, 음식물의 동화작용과 기초대사율에 기여하는 모든 생체활동과정에서 이루어지며, 열손실은 방열, 전도, 피부와 기도에서의 수분증발작용, 그리고 일부는 소변과 대변의 배설에 의하여 이루어진다. 인체의 기능이 정상적으로 유지되기 위해서는 일정한 체온이 요구되며 이는 열생산과 열손실의 균형으로 유지되는데, 여러 가지 병적인 원인으로 인하여 체온조절중추에 변조가 일어나게 되면 발열현상등과 같은 이상상태가 발생하게 된다¹²⁾.

한의학에서는 발열현상을 火, 熱 등으로 표현하였고 六氣가운데 暑, 火는 물론이고 風, 寒, 燥, 濕도 모두 火와 熱로 변화할 수 있다고 하였으며, 火와 熱로 변하는 까닭은 六淫의 邪가 인체의 생리적인 陰陽의 작용을 鬱滯, 沮止, 閉塞시키므로서 火와 熱로 변화한다고 하였다³⁾. 熱의 발생에 관하여 《靈樞·刺節眞邪篇》¹³⁾에 “虛邪之中人也, 邪漸動形, 起毫毛而發腠理, 其入深內, 搏于骨則爲熱”이라 하였고, 《素問·熱論》¹³⁾에서는 “人之傷于寒也則爲病熱”, 《素問·陰陽應象大論》에서는 “寒極生熱, 熱極生寒”이라고 하였으며, 《素問·刺熱篇》¹³⁾에서는 肝熱病, 心熱病, 脾熱病, 肺熱病, 腎熱病으로 五臟의 發熱에 대하여 설명하였다.

감염시 나타나는 발열현상은 체온조절기전이 파괴되어 나타나는 것이 아니라 체온조절의 목표가 되는 “set point”의 상승에 의한 것으로 생각된다. 따라서 발열환자는 상향조정된 “set point”에 따라 더위나 추위에 반응하게 된다¹⁴⁾.

세균에 감염되거나 염증이 있으면 단핵구나 대식세포로부터 내인성 발열물질(endogenous pyrogen)인 interleukin-1이 유리된다. 이들 발열물질은 시상하부의 온도 감수기에 작용하여 활동을 변화시키는 것으로 추측되며 이 과정에 프로스타글란딘들이 관여하

는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

실험실에서 흔히 쓰이는 LPS로 유발된 발열은 사이클로옥시게나제 및 산화질소신테이스와 매우 밀접한 관련이 있다. 프로스타글란딘 생합성 과정의 중요 효소인 COX-2는 사이클로옥시게나제의 동위형태로써¹⁶⁾, LPS와 사이토카인과 같은 염증성 자극에 의해 즉각적으로 유도되어 프로스타글란딘의 생합성을 증가시킨다^{16,17)}. COX-2 특이적 억제제가 LPS 유도성 발열에 해열작용을 나타낸다는 사실은 COX-2가 LPS의 복강내 주입에 의해 발생된 발열에서 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 단적으로 보여주는 것이다¹⁸⁾. LPS의 복강내 주입 후 발생하는 발열 동안 COX-2가 유도되는 첫 번째 자리는 주로 뇌의 혈관내피세포이다¹⁸⁾. 그러나 수많은 in vitro 연구논문들이 보고한 바를 보면, COX-2는 교세포와 대식세포에서도 잠정적으로 유도된다고 할 수 있다^{16,19,20)}

COX-2 mRNA는 정상쥐들의 telencephalic neurons에서도 탐지할 수 있었으며 LPS주입 후 증가하였으나, preoptic area를 비롯한 다른 뇌 영역의 신경세포와 교세포에서는 거의 탐지되지 않았다²¹⁾. LPS나 사이토카인은 in vitro와 in vivo에서 COX-2 뿐만 아니라 NOS 합성을 유발한다²²⁾. 체온조절이나 발열에 있어서 산화질소(NO)의 역할에 대해 논의된 많은 현대적 지식들이 최근 재검토되었다²³⁾.

NOS를 억제시키면 LPS에 의해 유발된 발열의 정도를 감소시킬 수 있다. 이러한 사실은 내인성 NO가 LPS 유도성 발열에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 나타내는 것이다²⁴⁾. NO가 발열을 일으키는 역할을 하고 있다는 것은 쥐, 돼지, guinea pig에서 LPS를 주입하여 발열을 일으킨 후 비특이적 NOS 억제제인 L-nitro-monomethyl-L-arginine (L-NAME)를 투여한 결과 발열반응을 부분적으로 억제시켰다는 관찰에 기초한 것이다^{7,24,25)}. 뇌에서 대부분의 NO는 neuronal NOS의 작용에 의해 합성된다²⁶⁾. TNF α , 인터루킨-1 β 와 같은 사이토카인은 LPS성 발열에 중요한 매개인자로서⁷⁾, 이러한 사이토카인이 생성되면 NOS가 활성화되게 되는데, 이러한 활성화는 NO가 LPS 투여 후 발생하는⁷⁾ 발열에 필수적이라는 것을 의미한다.

본 논문의 실험 결과에 의하면, LPS에 의해 자극된 murine macrophage에서 생성된 NO를 승마는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 유의성있게 억제시켰으며, LPS 유도성 발열에서는 승마 2.0g/kg(200mg/ml, 1ml/200g rat, 1시간마다 1회씩 2회 투여) 이상의 농도에서 유의성있게 억제되었고 그 효과는 인도메타신 3mg/kg의 효과와 비슷하였다.

승마는 미나리아재비과에 속한 多年生 草本인 끼질거리 및 同屬近緣植物의 根莖으로 性味는 甘, 辛, 微苦, 凉, 無毒하고 肺, 脾, 腎 三經에 歸經한다. 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣의 효능이 있어 麻疹, 牙齒痛, 口舌生瘡, 咽喉腫痛, 瘡瘍, 久瀉, 脫肛, 子宮脫垂, 脫腸등의 질환에 응용된다^{27,28)}.

승마의 根莖에는 cimicifugine, salicylic acid, tannin, resin, caffeic acid, ferulic acid, cimitin, alkaloid, 당류, 유기산, resin, glycosides, isoferulic acid, ferulic acid와 caffeic acid등의 약리성분이 함유되어 있다²⁹⁾.

《臨床本草學》²⁷⁾에서 승마는 清熱解毒의 효능이 있어 熱毒으로 인한 斑疹이나 陽明經의 熱毒으로 인한 牙齒痛, 口舌生瘡, 咽喉腫痛, 瘡瘍등의 증상을 다스리고 이 경우에는 金銀花, 連翹, 芍藥, 當歸등의 약물을 배합하여 응용한다 하였고, 《申氏本草學》³⁰⁾에서는 風腫諸毒과 喉痛紅腫에 退炎消腫하고, 石膏, 知母, 麥門冬, 竹葉을 배합하여 陽明熱極, 發斑頭痛, 口渴을 다스리고 葛根, 荊芥, 菊花, 甘草를 배합하여 肌肉間의 風熱을 치료한다 하여, 본 연구에서 대표적인 해열약제인 승마를 선택하여 그 효능과 기전에 대한 것을 밝히고자 하였다.

승마에 대한 최근의 연구동향으로 金³¹⁾의 실험에서 항Allergy 작용이 있음이 보고되었고, 그 약리적 효능은 鎮痛, 鎮靜, 血壓降下作用과 더불어 estrogene에 유사한 작용이 있으며, 膽汁의 分泌, 消炎效果, 皮膚真菌의 生長을 억제하는 작용이 있다고 보고하였다^{22,31-35)}.

LPS 발열에 대한 승마의 해열효과는 다음 세 가지 기전에 의해 매개되어 질 수 있다. 하나는 승마가 NOS를 억제시킴으로써 갈색지방조직에서 대사성 열생산이 억제되는 것이고³⁶⁾, 또 하나는 승마가 NOS

를 억제시킴으로써 내인성 해열 시스템이 활성화될 수 있다는 것이며^{36,37)}, 마지막으로 생각해 볼 수 있는 기전은 승마가 LPS에 의해 뇌혈관 및 뇌전체에서 증가된 COX-2를 억제함으로써 발열물질인 PGE₂의 생산이 감소되는 것이다^{7,8)}.

본 연구는 승마가 LPS에 의해 증가된 iNOS를 유의성있게 억제하는 것을 보여 준다. 그러므로 승마의 해열기전은 뇌에서 LPS에 의해 증가된 NO를 억제시킴으로써 NO에 의해 분비가 억제되어 있던 ACTH나 AVP와 같은 내인성 해열물질이 증가되는 것과 관련이 있을 수 있다. 그러나 본 연구는 LPS 투여 후 ACTH나 AVP의 변화에 대해 조사하지 않았으므로 가능성만 있음을 제시할 뿐이며, 이 점에 대해서는 더욱 연구가 이루어져야 할 것이다.

LPS를 복강내 주입^{8,18)}하면 발열이 생기는데, 이러한 모델은 복막염을 수반하는 병태생리적 질환을 대표하는 것이다. COX-2를 복강내로 주입한 경우 모두에서 발열의 time course와 뇌의 내피세포에서 발현되는 COX-2의 time course는 일치하였다^{8,38)}. 이러한 결과들은 뇌의 내피세포의 COX-2가 복막염과 중추성 염증 모두에서 발생하는 발열에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 제시하는 것이다. 그러므로 본 연구에서는 이상성 발열중 second phase에 쥐를 단두하여 뇌전체 및 뇌혈관에서 COX-2를 분석하였다. LPS성 발열은 COX-2 선택적 억제제인 NS-398 및 NSAIDs인 Indomethacin의 전처리에 의해 유의성있게 (비록 COX-1과 COX-2를 모두 억제하여 해열시키지만) 억제된다.^{8,38-40)}

본 연구에서도 LPS를 복강으로 투여하고 바로 Indomethacin을 구강에 투여하였을 때 유의성있게 발열을 억제시켰다. Indomethacin을 복강이 아닌 구강으로 투여하여 반응속도가 느린 점이 있었지만 3mg/kg을 투여하였을 때 유의성있는 변화를 나타내었다.

뇌의 내피세포에서 COX-2 의존적으로 생산된 PGE₂가 생성된 후 뇌의 실질로 분비되던, CSF로 분비되던 결국 PGE₂는 체온조절중추의 신경세포에 작용하여 발열을 일으키는데, 승마는 PGE₂가 생성되기

전단계에서 COX-2 발현을 억제시켜 해열작용을 나타내었다. 본 실험에서 COX-2 단백질 발현에 대해서만 분석하고 COX-2 activity에 대해서는 분석하지 않았기 때문에 승마가 COX-2 activity에 미치는 영향에 대해서는 결론을 내릴 수 없고 다만 가능성만 제시하고자 한다.

요약하면 승마는 LPS성 발열을 농도의존적으로 억제시키는 해열작용을 가지고 있으며, 승마의 해열 효과는 뇌에서 LPS에 의해 증가된 iNOS 및 COX-2를 억제시키는 것과 관련이 매우 깊다. 또한 뇌에서 LPS에 의해 증가되는 COX-2 및 iNOS가 가장 주요하게 발현되는 부위는 뇌의 혈관세포이다. 승마의 해열효과는 COX-1 및 nNOS와는 관련이 없었다. LPS성 발열에 승마를 투여하였을 때 저체온 현상이 나타나는 것으로 보아 교감신경절에 분포한 nNOS를 억제시켰을 가능성을 배제할 수는 없기 때문에, 이는 승마의 해열효과가 nNOS와 관련이 있을 가능성이 있음을 제시하는 하는 것이다. 결론적으로 말하면, LPS에 의한 말초성 염증은 뇌에서 COX-2와 iNOS 발현을 증가시켜 발열을 일으켰으며, 승마는 COX-2와 iNOS를 억제시켜 해열작용을 나타냈다.

결론

이 연구에서는 LPS에 의해 유발된 발열모델에서 승마가 발열에 미치는 효과와 뇌전체 및 뇌혈관에서 해열의 한 지표인 COX-1/COX-2 및 iNOS/nNOS의 발현양상에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 murine macrophage에서 승마는 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.
2. LPS에 의해 유도된 발열에서 승마는 강력한 해열 효과를 나타냈으며 그 효과는 농도 의존적이었다.
3. LPS성 발열모델에서 승마는 말초성 염증에 의해 뇌에서 증가된 COX-2 및 iNOS를 억제시켜 해열 효과를 나타냈다.
4. LPS성 발열모델에서 승마는 COX-1 및 nNOS에

전혀 영향을 미치지 않았다.

이러한 연구의 결과들은 LPS 유도성 발열모델에 있어서 승마가 강력한 해열효과를 나타내며, 그 효과는 뇌의 COX-2와 iNOS를 경유한 프로스타글란딘계 및 산화질소계와 관련이 있음을 제시하는 것이다. 또한 말초성 염증에 의해 증가된 COX-2와 iNOS를 억제시키는 승마의 소염효과는 산화질소계 및 COX-2와 관련이 있는 복막염, 중추성염증 및 관절염과 같은 질환에도 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

참고문헌

1. 姜斗熙. 生理學. 서울: 신광출판사. 1981: 13-1,13-4.
2. 李文鎬. 內科學(上). 서울: 博愛出版社. 1977.
3. 安秉國. 內科總論. 서울: 경희대학교 한의학부 내과학교실. 1970: 42,48.
4. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. New concepts on the pathogenesis of fever. Rev Infect Dis. 1988 Jan-Feb;10(1):168-89. Review.
5. Kluger, MJ. 1991 Fever: role of pyrogens and cryogens. Physiol. Rev. 71:93-127.
6. Kent S, Bluth RM, Kelley KW, Dantzer R. Sickness behavior as a new target for drug development. Trends Pharmacol Sci. 1992 Jan;13(1):24-8. Review.
7. Scammell TE, Elmquist JK, Saper CB. Inhibitor of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. American Journal of Physiology 1996;271:R333-R338.
8. Matsumura K, Cao C, Ozaki M, Morii H, Nakadate K, Watanabe Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. J Neurosci. 1998 Aug 15; 18(16):6279- 89.
9. 吳明, 姜玫鎬. 레이저응용. 서울: 淸文閣. 1984: 1,9,105,116,120-121.
10. 任華軟. 光鍼. 日本: 醫道の日本. 1981: 441:26.
11. Kim SJ, Kim MS. Inhibitory effects of cimicifugae rhizoma extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. Phytother Res. 2000 14(8):596-600.
12. Sakurai N, Nagai M. Chemical constituents of original plants of cimicifugae rhizoma in chinese medicine. Yakugaku Zasshi. 1996;116(11):850-865.
13. 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問 靈樞合編. 臺北: 臺聯國風出版社. 1973: 素問35,224,231-238,靈樞435.
14. 성호경. 생리학. 의학문화사. 1997:353-355.
15. Saper CB. Neurobiological basis of fever. Ann New York Acad Sci. 1998;856:90-4.
16. Goppelt-Struebe M (1995) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. Prostaglandins Leukot and Essent Fatty Acids. 52:213-222.
17. Brian JE Jr, Moore SA, Faraci FM. Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. Stroke. 1998; 29: 2600-6.
18. 金英蘭. 몇가지 생약의 항알레르기 작용. 全南大學校大學院 碩士學位論文. 1993.
19. Breder CD, Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. Brain Res. 1996;713:64-9.
20. Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, DeWitt D, et al. Intravenous lipopolysaccharide induced cyclooxygenase-2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. J Comp Neurol. 1997;381:119-29.
21. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Induction by lipopolysaccharides of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. Brain Res. 1995; 697:187-96.
22. 李尚仁. 本草學. 修書院. 197,58,101-106,195,203-204,407.
23. Schmid HA, Riedel W, Simon E. 1998. Role of nitric

- oxide in temperature regulation. *Prog Brain Res* 115, 87-110.
24. Parrott RF, Vellucci SV, Lloyd DM. 1998 Effects of intravenous nitric oxide inhibitors on endotoxin-induced fever in prepubertal pigs. *Gen Pharmacol.* 31, 371-376.
25. Reimers JJ, Bierre U, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. 1994. Interleukin-1 β induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases. *Cytokine* 6, 512-520.
26. Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. 1992 Mapping of nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitric signal transduction. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:1439-1456.
27. 辛民教. 임상본초학. 남산당. 1986: 540-541.
28. 尹吉榮, 東醫方劑學. 高文社. 1980: 48-51,64.
29. 上海科學出版社. 中藥大辭典 前10권 부록1권. 1998: 3362-3372.
30. 申佶求, 申氏本草學. 壽文社. 1988: 223-226.
31. 홍사섭 編著. 이우주의 藥理學 講義. 醫學出版社. 1992: 293-307.
32. 姜暉垓. 加味升麻葛根湯의 效能에 관한 實驗的 研究. 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文. 1992.
33. 趙貞實. 升麻葛根湯과 Tetracycline-HCl의 併用投與時 抗菌 및 抗炎效果에 관한 研究. 中央大學校 大學院 碩士學位論文. 1983.
34. 王浴生 主編. 中藥藥理與應用. 人民衛生出版社. 1983: 207-211,264-277,136-1141,424-431, 434-439,118-128,400-405.
35. 金南權. 升麻葛根湯加味方이 마우스의 抗 Allergy 및 免役反應에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 外觀科學位論文. 1994: 34.
36. de Luca B, Monda M, Sullo A. Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol.* 1995 268(6 Pt 2):R1533-1538.
37. Rivier C. Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne interleukin-1 beta: role of vasopressin, prostaglandins, and alpha 1-adrenergic receptors. *Endocrinology.* 1995 136(8):3597-603.
38. Cao C, Matsumura K, Ozaki M, Watanabe Y. Lipopolysaccharide injected into the cerebral ventricle evokes fever through induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells. *J Neurosci.* 1999 15;19(2):716-25.
39. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T, Watanabe T. (1987) Evidence for separate mechanisms of induction of biphasic fever inside and outside the blood-brain barrier in rabbits. *J Physiol (Lond)* 383:629-637.
40. Hashimoto M, Bando T, Iriki M, Hashimoto K. (1988) Effect of indomethacin on febrile response to recombinant human interleukin 1-a in rabbits. *Am J Physiol* 255:R527-R533.