

CFA에 의해 유도된 白鼠모델 關節炎에서 大羌活湯의 鎮痛效果

서윤정¹ · 구성태¹ · 양윤정¹ · 김 산¹ · 유인식¹ · 임규상¹

¹원광대학교 한의학전문대학원 제 3 의학과 동통연구실험실

Analgesic effect of Daeganghwal-Tang on a rat model of CFA-induced arthritis

Yoon-Jung Seo¹, Sung-Tae Koo¹, Yoon-Jung Yang¹, San Kim¹, In-Sik Yoo¹, Kyu-Sang Lim¹

¹Pain Research Lab, Dept. of the 3rd Medicine,
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objectives : Daeganghwal-Tang(DGHT) is one of the prescriptions used for the treatment of rheumatoid arthritis(RA) in oriental medicine. The present study aimed to examine the analgesic effect of DGHT on a rat model of CFA-induced arthritis, and the relations between DGHT-induced analgesia and endogenous nitric oxide(NO) and inducible NO synthase(iNOS)/neuronal NOS.

Methods : CFA-induced arthritis model used to test the effect of DGHT was chronic pain model. After the induction of arthritis, rats subsequently showed a reduced stepping force of the affected limb for at least the next 18 days. The reduced stepping force of the limb was presumably due to a painful knee. DGHT dissolved in water was orally administrated. After the treatment, behavioral tests measuring stepping force were periodically conducted during the next 4 hours.

Results : DGHT produced significant improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis lasting at least 2 hours. DGHT produced the improvement of stepping force of the affected hindlimb in a dose-dependent manner. Both NO production and nNOS/iNOS protein expression which is increased by arthritis were suppressed by DGHT administration.

Conclusions : The data suggest 1) that DGHT produces a potent analgesic effect on the chronic knee arthritis pain model in the rat and 2) that DGHT-induced analgesia modulate endogenous NO through the suppression of nNOS/iNOS protein expression.

Key words : Daeganghwal-Tang, CFA-induced arthritis, NOS, NO

I. 緒 論

류마티오이드 관절염 (Rheumatoid arthritis)은 만성 관절염 중 퇴행성 관절질환 다음으로 흔히

• 교신저자 : 임규상, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문 대학원 제3의학과, Tel. 063-858-0457, Fax. 063-850-5195, E-mail : kslim@wonkwang.ac.kr

• 이 논문은 BK21 사업의 연구비와 2002년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

• 접수 : 2004/06/18 · 수정 : 2004/09/15 · 채택 : 2004/12/17

볼 수 있는 질환으로서 원인불명의 만성 전신질환이며 주로 말초관절에 염증을 일으키고 대칭적으로 생기며 전신증상으로는 血液, 肺, 神經 및 心血關係 등의 이상을 일으키는 자가면역 질환이다^{1,2)}.

류마티오이드 관절염은 한의학에서 제반 감각운동장애를 총칭하는 痺症의 범주에 속한다^{3,4)}고

보며, 원인은 대체로 六淫 중 風寒濕의 침범을 받아 營衛가 不行함으로써 발병한다^{5,6)}고 본다. 치료는 宣通시켜 氣血과 營衛가 순행함으로써 痺痛이 자연스럽게 소실⁷⁾되게 하는 것인데 대표적인 처방이 大羌活湯이다.

大羌活湯은 羅⁸⁾의 《衛生寶鑑》⁹⁾에 수록된 처방으로 風濕相搏하여 肢節疼痛하며 不可屈伸한 症을 치료¹⁰⁻¹²⁾하며 風濕에 傷하여 나타나는 頭身疼痛, 身體沈重, 肩背膝髓腫痛 등 症에 祛風濕, 通經絡, 止痛의 효능^{9,13,14)}이 있다.

大羌活湯에 대한 연구로 李¹⁵⁾가 大羌活湯이 제II형 Collagen유발 관절염의 항체에 미치는 영향, 金¹⁶⁾이 大羌活湯의 소염·진통작용에 관한 연구, 申¹⁷⁾이 大羌活湯의 이노·진통작용에 관한 연구 등이 있으나 실험방법에 있어 본 논문에서는 大羌活湯의 진통작용을 究明하기 위해 Complete Freund's adjuvant(CFA) 유발성 관절염 모델을 사용하였는데, 이 모델은 인간의 류마티스 관절염과 상당히 비슷한 병리적인 특징을 보여주고 있다¹⁸⁾.

본 연구의 주된 논점은 1) 大羌活湯이 관절염으로 유발된 통증을 완화시킬 수 있는가, 2) 만성 관절염에 의해 증가된 NO 및 iNOS, nNOS는 大羌活湯의 진통작용과 어떤 관련이 있는가이다. 이는 大羌活湯의 君藥인 羌活, 升麻의 歸經이 腎經, 膀胱經, 胃經 등인 것에 착안하여 족관절염에 미치는 대강활탕의 진통효과를 살펴보고자 하였다.

본 연구는 관절염 모델을 이용하여 위와 같은 논점들을 밝힘으로써 大羌活湯의 진통작용과 만성 통증모델에서의 작용기전에 대해 실험적으로 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 실험동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley(6주령, 170-190 g)가 사용되었으며, 원광대학교 한의학전문대학원에서 사육되었다. 동물은 온도 22±1 °C, 상대습도 55±1 0%의 조건에서 12시간 주기로 주야를 바꿔주면서(야간 사이클: 오전 8:00 ~ 오후 8:00) 한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 시료와 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.

Table 1. Prescription of Daeganghwat-Tang

한약명	생약명	용량(g)
강 활	Rhizoma Seu Radix Notopterygii	6g
승 마	Rhizoma Cimicifugae	6g
독 활	Radix Aralia Cordatae	4g
창 출	Rhizoma Atractylodis Japonicae	3g
방 기	Radix Cocculi Seu Stephaniae Tetrandrae	3g
위령선	Radix Clematidis	3g
백 출	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	3g
당 귀	Radix Angelicae Sinens	3g
적복령	Poria	3g
택 사	Rhizoma Alismatis	3g
감 초	Radix Glycyrrhizae	3g
총 량		40g

3. 大羌活湯 검액 조제

대강활탕 총 5첩에 해당하는 200 g을 물 2,010 ml와 함께 환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 2시간동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 52 °C에서 진공농축으로 감압 농축시켜 -70 °C에서 24시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결 건조하여 22.5 g의 분말시료를 얻었다. 실험군에서 대강활탕 검액은 구강으로 투여하였다.

4. 관절염 모델 유도

만성관절염은 Enflurane(Ilsung pharmaceuticals, Seoul, Korea)과 O₂로 혼합된 마취상태에서 쥐의 오른쪽 무릎 관절강 내로 125 μl의 Complete Freund's adjuvant(CFA, 250 μg의 heat-killed *Mycobacterium butyricum* 함유)를 주입하여 유발시켰다. CFA는 Incomplete Freund's Adjuvant(Difco, Detroit, MI, USA) 4 ml에 *Mycobacterium butyricum*(Difco, Detroit, MI, USA) 16 mg을 용해시킨 후 생리식염수 4 ml과 혼합하여 만들었으며, 사용 시 잘 혼합하여 주입하였다. 주입 후 마취를 중단하였으며, 수술 받은 쥐들은 모두 510분 후에 마취에서 회복되었다.

5. 동물행동 테스트

통증 정도를 측정하기 위해서 관절염이 유도된 후의 바닥을 밟는 힘을 측정하였다. 동물을 투명한 아크릴로 만든 긴 통로(폭 10 cm, 높이 10 cm, 길이 60 cm)를 자유롭게 걷게 하고, 통로 바닥의 절반에 전자저울(Acculab, Pocket pro 250-B, Newton, PA, USA)을 설치하여 한쪽 발이 디디는 압력만을 측정하였다. 전자저울

에서 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.

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

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

관절염 모델 동물의 foot stepping pressure (FSP) threshold에 대한 Time Course는 관절염 유도 후 24시간마다 측정하여 한달 동안 관찰하였다.

6. 단백질의 분리 및 정제

척수에서 iNOS, nNOS 단백질 발현을 측정하기 위하여 대조군, CFA-유도 관절염 실험군 및 관절염에 大羌活湯을 처리한 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 때까지 -80 °C에 보관하여 놓았다. 보관된 척수에 homogenization buffer 3ml을 가하여 Homogenizer로 3회 (15초 같고 10초 쉬는 행위를 3회 반복) 균질화

시킨 후, 3,000×g로 10분동안 원심분리시켰다. 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80 °C에 저장하여 놓았다. 이 시료는 iNOS, nNOS 단백질을 분석하기 위해 사용되었다. 이 시료를 4°C에서 13,000×g로 10분동안 2회 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80 °C에 저장하여 놓았다.

7. 산화질소 정량

척수조직 내 산화질소(NO) 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 안정된 마지막 산물인 NO₂와 NO₃에 대해서 분석하였다.

과정을 간략하면, 각 샘플 40 μl와 MOPS buffer(50 mM MOPS/1mM EDTA, pH 7.0) 45 μl를 혼합하고 reconstituted *Escherichia coli* nitrate reductase(500μl MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5 μl를 가한 후 2 mM NADH 10 μl를 가하여 20분동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 50 μl Griess reagent A(1 % sulfanilamide in 3N HCl)와 짧게 반응시키고, 50 μl 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. Nitrite 농도의 표준곡선은 NaNO₂로부터 계산되었다.

8. Western blot 분석

단백질 Blotting을 위하여 보관하여 놓은 단백질 시료를 5배 농축된 SDS sample buffer (1×125mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % glycerol, 0.003 % bromophenol, 1 % β-mercaptoethanol)와 섞어서 98°C에서 5분간 끓인

후 10,000 rpm에서 5-10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel (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, 10 % NaH₂PO₄를 포함)에 blocking을 하고, anti-iNOS, anti-nNOS antibody를 1:1000으로 하여 1시간동안 반응시킨 후 4 °C에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody(Anti-rabbit IgG)와 2시간동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) developing kit를 사용하여 발색, 감광시킨다.

9. 통계분석

데이터는 Mean±SEM으로 나타내었다. 통계 검사는 Dunnett's post-hoc test에 의한 one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA)로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있다고 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. CFA 유도 관절염 수술 후의 하지의 Weight Bearing Force(WBF) 변화

CFA를 슬관절강 내 주입하여 유발시킨 만성 관절염 모델에서 주입 전 및 후 30일 동안 주입한 쪽 하지의 WBF 변화를 측정하였다. Fig. 1은 8 마리 실험동물에서 주입 전 및 후 30일 동안 관절염에 의해 감소된 하지의 stepping force의 평균값을 나타낸 것이다. 모든 동물은 CFA

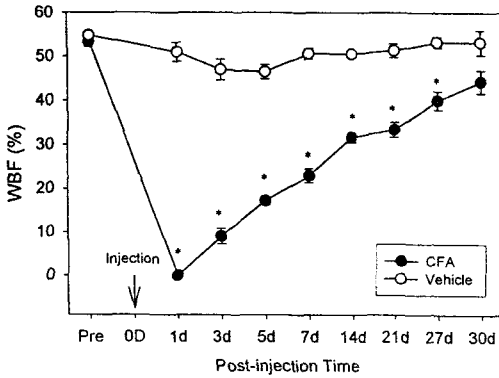


Fig. 1. Change in WBF of the limb before and after CFA-induced arthritis. Post-injection time is expressed as days after CFA injection. Pre-injection control was taken one day before the injection (Pre). Animals were subjected to the injection of CFA into the knee joint on the left side of rats. All animals 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(Pre value). This figure shows average values(\pm SEM) of WBF of the affected hindlimb in a group of 8 rats one day before and at various days for 30 days after induction of arthritis. Post-injection time is expressed as d for days. Asterisks indicate values significantly different ($p < 0.05$) from the pre-injection control value by one-way repeated measure ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test ($n=8$)

주입으로 관절염이 유도된 후 다음날 주입한 쪽 하지의 WBF가 0까지 크게 감소되었다. Stepping force가 수술 후 몇 시간 후부터 유의하게 감소되는지는 테스트하지 않았으나 수술 후 24 시간에는 stepping force가 0까지 감소되었으며 이틀째부터 점차적으로 회복되기 시작하여 2주 후부터 일정하게 감소된 상태를 유지하다가 수술 후 30일째에는 거의 회복되었다. 이러한 WBF의 감소는 CFA가 유도된 쪽 발을 밟을 때

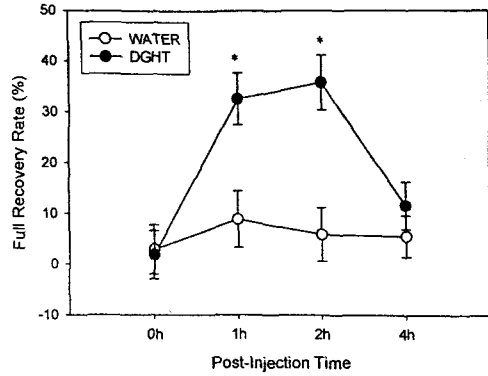


Fig. 2. Effect of DGHT on reduced weight bearing force (WBF) in a CFA-induced arthritic rats. All animals were subjected to the injection of CFA into the knee joint on the right side of rats and showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis from 1 day after the induction of arthritis as evidenced by a dramatic lowering of foot stepping force when compared to the preoperative value. DGHT 2 g/kg(400 mg/ml, 1 ml/200g/rat) or water was orally administered to the rats. After the termination of the treatment, behavioral test measuring WBF was periodically conducted at 1h, 2h, 4h. DGHT showed a significant improvement of stepping force of the limb affected by arthritis. In 8 rats with arthritis, water only and DGHT dissolved in water were applied for 2 days from 9th day (about 60g of stepping force of the affected limb) after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner. Asterisks indicate the values that are significantly different from the pre-treatment baseline value (0h) ($p < 0.05$) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

염증으로 인한 통증을 줄이기 위한 행동의 결과로 볼 수 있으며, 이러한 WBF 값을 통증에 대한 척도로 삼았다 (Fig. 1).

2. 관절염 모델에서 대강활탕의 진통 효과

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유발된 관절

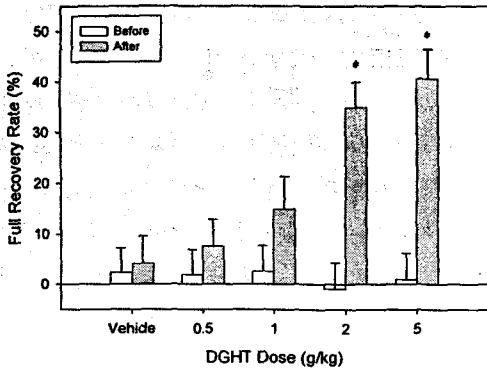


Fig. 3. Analgesic effects produced by graded doses of DGHT on WBF of the limb reduced by CFA-induced arthritis. All animals were subjected to the injection of CFA into the knee joint on the right side of rats and showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis from 1 day after the induction of arthritis as evidenced by a dramatic lowering of WBF when compared to the preoperative value. Several doses of DGHT(0.5, 1, 2, 5 g/kg 1ml/200g/rat) or water was orally administrated to the rats. After termination of the treatment, behavioral test measuring WBF was periodically conducted at 1h, 2h, 4h. In 8 rats with arthritis, water only and several doses of DGHT dissolved in water were applied for 5 days from 8th day (about 55g of WBF of the affected limb) after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner. Post-injection values (After) were calculated by averaging the responses at the 1 and 2 hour after administration of DGHT or water. Asterisks indicate values significantly ($p < 0.05$) different from the pre-treatment baseline value (Before) by one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test.

염 모델에서 오른쪽 하지의 WBF에 대한 대강활탕의 효과가 대조군과 실험군의 두 그룹에서 실험되었다. 모든 동물은 CFA의 주입으로 관절염이 유도된 후 동측 하지의 WBF이 현저하게

감소하였다. 실험군은 구강으로 대강활탕을 투여하였으며, 대조군은 구강으로 물을 투여하였다. 약물투여 후, 두 군 모두 1시간, 2시간, 4시간째에 행동 테스트를 실시하였다. 실험군은 처치 후 1시간, 2시간에 baseline value에 비해 큰 상 받은 무릎과 동측 하지의 WBF가 각각 최대로 회복할 수 있는 양의 $32.75 \pm 5.08 \%$ 와 $36.0 \pm 5.32 \%$ 로 유의하게 개선되었다. 대조군은 실험하는 4시간동안 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 실험군은 1시간째 stepping force의 변화가 가장 높았으며, 시간이 지남에 따라 점차 감소하기 시작하였으며, 대강활탕의 진통효과는 적어도 2시간정도 유지되었다(Fig. 2).

이러한 결과는 CFA-유도 관절염에서 대강활탕은 관절염에 의해 감소된 stepping force를 유의하게 개선시킨다는 것을 알 수 있으며, 대강활탕이 만성 슬관절염에 진통효과를 나타낸다고 이야기 할 수 있다.

3. 관절염 모델에 있어서 대강활탕의 농도에 따른 진통효과

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유발된 관절염 모델에서 주입한 쪽 하지의 WBF에 대한 여러 농도의 대강활탕의 효과를 대조군과 네 그룹의 실험군을 통하여 알아보았다. 모든 동물은 CFA 주입으로 관절염이 유도된 후 동측 하지의 WBF가 현저하게 감소되었다. 실험군은 0.5, 1, 2, 5 g/kg 농도의 대강활탕을 구강으로 투여하였고, 대조군은 물을 구강으로 투여하였다. 처치 후 모든 그룹은 1시간, 2시간, 4시간째에 행동 테스트를 실시하였다. 실험군 및 대조군의 진통효과 비교는 처치후 1시간, 2시간의 효과를 평균 내어 각각 평균값끼리 비교하였다.

대강활탕 0.5 및 1 g/kg을 투여한 실험군 및 물을 투여한 대조군은 감소된 WBF에 대해 유

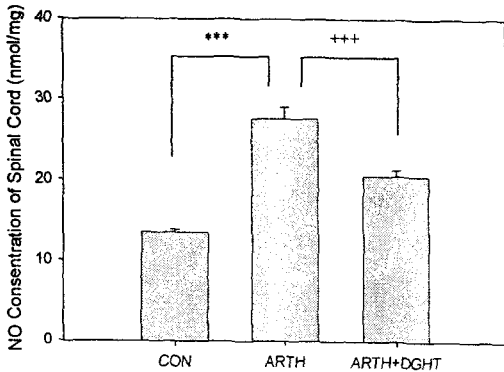


Fig. 4. Effect of DGHT on the nitrite/nitrate levels of spinal cord in the different experiment groups. NO production on the spinal cord was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. Arthritis group was not performed any other treatment except for water administration. DGHT was applied one time every day for 5 days on arthritis rats of different group. Control group were not applied any other treatment. Data are expressed as means±SEM. *** $p < 0.001$, compared with the untreated control group. +++ $p < 0.001$, compared with the arthritis group.

의성있는 개선을 보여주지 못하였으나 대강활탕 2 g/kg, 5 g/kg을 투여한 실험군은 관절염에 의해 감소된 WBF을 유의하게 개선시켰으며, 그 효과 또한 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 3).

이러한 결과들로부터 CFA-유도 관절염에서 대강활탕은 관절염에 의해 감소된 WBF를 농도 의존적으로 유의하게 개선시켰으며, 적어도 대강활탕 2 g/kg이상의 농도를 투여해야 진통효과가 나타난다는 것을 알 수 있다.

4. 관절염 동물의 척수에서 NO 분석

슬관절강 내 CFA를 주입함으로써 유발된 관절염 모델에서 5일간 매일 대강활탕을 투여하고 6일째 척수에서 NO를 분석하여 관절염에 의해

증가된 NO에 대해 대강활탕이 미치는 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 모든 동물은 CFA 주입으로 관절염이 유도된 후 환측 하지의 WBF이 현저하게 감소하였다. 5일째 처치 후 6일째 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대강활탕을 처치한 동물들의 척수에서 NO를 분석해본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 NO의 생산이 유의하게 증가하였으며, 대강활탕을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해 유의하게 NO가 감소하였다(Fig.4).

이러한 결과는 CFA-유도 슬관절염에서 대강활탕이 관절염에 의해 증가된 NO를 억제시킬 수 있다는 것을 시사하며, 만성관절염에서 대강활탕의 진통작용은 NO와 관련이 있음을 알 수 있다.

5. 관절염 동물의 척수에서 iNOS 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 CFA를 주입함으로써 유발된 관절염 모델에서 5일간 매일 대강활탕을 투여하고 6일째 척수에서 iNOS 단백질을 분석하여 관절염에 의한 iNOS 단백질의 증가 여부와 이에 대한 대강활탕의 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 모든 동물은 CFA 주입으로 관절염이 유도된 후 환측 하지의 WBF이 현저하게 감소하였다. 5일째 처치 후 6일째 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대강활탕을 처치한 동물들의 척수에서 iNOS를 분석해 본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 iNOS가 유의하게 증가하였으며, 대강활탕을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해 iNOS가 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

이러한 결과는 CFA-유도 슬관절염에서 대강활탕이 관절염에 의해 증가된 iNOS를 억제시킨다는 것을 보여주며, 이는 만성관절염에서 대강

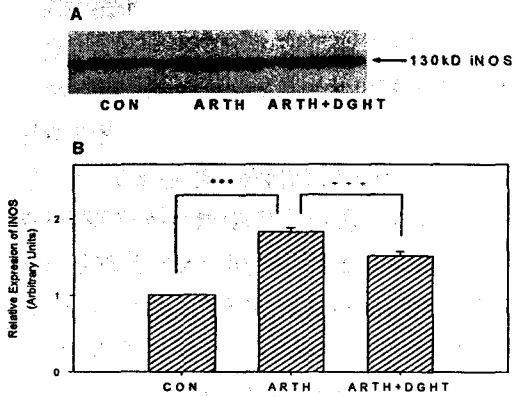


Fig. 5. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of iNOS expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. DGHT was applied one time every day for 5 days on arthritis rats. Control group (CON) were not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to the of iNOS. The iNOS signal was enhanced in the sample from the CFA-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from DGHT-treated arthritis group when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 60 μ 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.

활탕의 진통작용은 iNOS와 관련이 있음을 시사한다.

6. 관절염 동물의 척수에서 nNOS 단백질에 대한 Western blot 분석

슬관절강내 CFA를 주입함으로써 유발된 관절염 모델에서 5일간 매일 대강활탕을 투여하고 6일째 척수에서 nNOS 단백질을 분석하여 관절염에 의해 nNOS 단백질의 증가 여부와 이에 대한 대강활탕의 영향을 알아보기 위해 실험하였

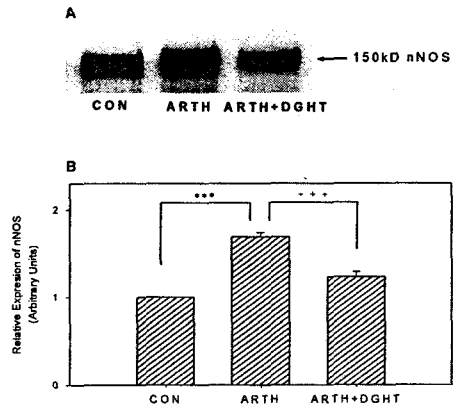


Fig. 6. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of nNOS expression in the spinal cord samples from the several groups. Arthritis group was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. DGHT was applied one time every day for 5 days on arthritis rats. Control group (CON) was not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to the of nNOS. The nNOS signal was enhanced in the sample from the CFA-induced arthritis when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from DGHT-treated arthritis groups when compared with that from the arthritis group (ARTH). Each lane was loaded with 30 μ 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.

다. 모든 동물은 CFA 주입으로 관절염이 유도된 후 환측 하지의 WBF가 현저하게 감소하였다. 5일째 처치 후 6일째 정상동물과 관절염동물 및 관절염 유도 후 대강활탕을 처치한 동물들의 척수에서 nNOS를 분석해 본 결과, 관절염 동물은 정상동물에 비해 nNOS가 유의하게 증가하였으며, 대강활탕을 처치한 슬관절염 동물은 관절염 동물에 비해 nNOS가 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

이러한 결과는 CFA-유도 슬관절염에서 대강

활탕이 관절염에 의해 증가된 nNOS를 억제시킨다는 것을 의미하며, 이는 만성관절염에서 대강활탕의 진통작용은 nNOS와 관련이 있음을 시사한다.

IV. 考 察

산업 문명이 발달하고 사회구조가 복잡해짐에 따라 스트레스가 많아지고 식생활 변화나 환경 오염 등으로 인해 관절염 환자들은 계속 증가하는 추세이다. 특히 류마티드 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 관절 변형과 관절강직을 유발하며 전신적으로 증상을 일으킨다^{1,2)}.

미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology : ACR)(1996)에서는 류마티스 관절염의 치료를 위해서 사용되는 치료법으로 약물치료와 수술적 처치 그리고 보전적인 방법들이 존재한다고 하였다¹⁹⁾. 약물치료를 제외하고는 염증을 줄이는데 큰 의미가 없으며 소염진통제의 투여도 활동적인 경우에만 필요하므로 많은 환자의 경우 단지 정기적인 관찰만을 필요로 한다고 할 수 있다¹⁾.

류마티드 관절염의 직접적인 원인은 아직 규명되어 있지 않으나 환경적인 요인과 유전적인 소인들이 복합적으로 작용하여 관절염이 발생되는 것으로 추정하고 있다. 이러한 원인에 대하여 면역 조절기전의 이상이 초래되고 만성 염증이 특히 관절을 중심으로 지속되고 조직의 손상이 지속적으로 일어난다고 인정되고 있다¹⁾.

병의 경과를 매우 다양하여 예측하기가 어려우며 일부 환자는 관절의 손상없이 치유되기도 하나 대부분의 환자는 반복되는 치료경과를 갖게 된다.

류마티드 관절염은 韓醫學의 제반 증상 중에서 특히 痺, 痛痺, 歷節風, 白虎風, 膝眼風, 風痺, 類風濕性關節炎 등에 속하며, 그 중에서 가장 포괄적이고, 제반 감각운동장애를 총칭하는 痺症의 범주에 속한다^{3,4)}고 볼 수 있다.

痺는 風寒濕 三邪가 인체의 營衛失調, 腠理空疏, 正氣虛弱한 틈을 타고 인체의 肌表, 經絡으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 氣血이 不暢^{20,21)}하게 되니 임상적으로 筋骨, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 酸脹, 重着, 麻木, 關節의 腫大, 屈伸不利 및 심하면 關節의 強直性 變形를 초래하게 되는 것이다. 痺症의 치법은 宣通시키는 것이며, 氣血과 營衛가 循行하면 痺痛은 자연스럽게 소실⁷⁾되는데 대표적인 처방이 大羌活湯이다.

大羌活湯은 羅⁸⁾의 《衛生寶鑑》⁹⁾에 처음 수록되어 있으며, 風濕相搏하여 肢節疼痛하며 不可屈伸한 症을 치료¹⁰⁻¹²⁾하며 風濕에 傷하여 나타나는 頭身疼痛, 身體沈重, 肩背膝髓腫痛 등 症에 祛風濕, 通經絡, 止痛의 效능^{9,13,14)}이 있다.

大羌活湯 처방 구성은 문헌에 따라 다소 차이가 있으나 주로 羌活, 升麻, 獨活, 蒼朮, 防己, 威靈仙, 白朮, 當歸, 赤茯苓, 澤瀉, 甘草로 구성되어 있고, 혹 防風을 加하거나 防己, 白朮, 甘草를 去하여 사용하기도 하였다^{9,13,14)}.

大羌活湯에 대한 연구결과로서 李¹⁵⁾의 보고에 의하면 大羌活湯은 제II형 Collagn 유발 관절염에서 IgG 항collagen 항체형성 억제 효과가 유의성 있게 인정되었다. 또 金¹⁶⁾의 보고에 의하면 大羌活湯은 거의 독성이 없는 소염, 진통제로 사용할 수 있다고 했다. 그리고 申¹⁷⁾의 보고에 의하면 大羌活湯은 염증성 질환의 치료제로서 그 효능이 입증되었으며 이노효과의 인정은 부종을 수반한 염증성 질환에 유효하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다고 했다.

본 연구는 大羌活湯의 효능 중 진통효과를 입

증하기 위해 만성 통증모델인 CFA 유발 슬관절염 모델을 이용하였다¹⁸⁾. 관절통 및 관절염을 연구하기 위해서 실험실에서는 사람의 염증상태를 모방하여 다양한 동물모델을 이용하여 왔다^{22,23)}. CFA 유발 관절염 모델은 인간의 류마티스 관절염(RA)과 일치하지는 않지만 RA의 일반적인 특징을 많이 가지고 있기 때문에 실험실에서 많이 사용하는 동물모델로서 여러 편의 논문들이 이 모델이 만성 통증을 나타냄을 이미 밝힌 바 있다^{18,24)}. 무릎 관절강내에 CFA를 편측으로 주입하면 수 시간내에 주입한 쪽에 hyperalgesia가 발생하게 된다. 이러한 hyperalgesia는 adjuvant 주입 후 8주간이나 지속된다고 한다²⁵⁾. Adjuvant 유도성 관절염 모델은 만성 관절염에 대한 신약의 항염 및 진통작용을 분석하기 위해 광범위하게 이용되어지고 있다¹⁸⁾.

본 논문에서는 CFA 주입으로 유발된 염증성 통증에 대한 계측기준(parameter)으로서 손상된 무릎의 동측 발이 디디는 압력의 변화를 측정하였다. 손상된 무릎의 동측 발이 디디는 압력 변화는 류마티스 관절염의 특징인 관절의 무능력을 잘 반영할 수 있는 방법이며, 무릎 관절의 운동성에 대한 개선을 전반적으로 예측할 수 있는 방법이다. 그러므로 CFA 유발 슬관절염 동물모델은 만성 통증에 대한 大羌活湯의 진통기전을 연구하는데 유용할 것이다.

이러한 동물모델을 이용하여 관절염이 유발된 동물에게 大羌活湯을 구강으로 투여한 결과, 大羌活湯은 관절염에 의해 감소된 stepping force를 유의하게 개선시킨다는 것을 알 수 있으며, 大羌活湯이 적어도 2시간 동안 지속되는 진통효과를 발생시킨다는 것을 증명했다. 이로써 大羌活湯이 만성 슬관절염에 진통효과를 나타낸다고 이야기 할 수 있다. 이러한 진통효과는 농도의존적으로 나타나는데 적어도 大羌活湯 2 g/kg이

상의 농도를 투여해야 진통효과가 나타난다는 것을 알 수 있다. 비록 이번 연구가 실험적 동물 모델에서 大羌活湯의 효과를 명확하게 보여주고는 있지만, 그 진통효과의 기전은 불명확하다.

본 연구는 CFA의 관절강내 주입에 의해 발생된 만성 관절염 동물모델에서 大羌活湯의 진통작용과 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 NOS가 어떤 관계가 있는지 밝히고자 하였다.

CFA에 의해 만성 관절염이 유발된 후 척수에서 nNOS 및 iNOS 단백질 발현이 증가되어 NO 생산이 증가되며, 이러한 NO는 만성 관절염 모델에서 발생하는 hyperalgesia에 매우 중요한 역할을 하고 있다²⁶⁾. NO는 1980년대부터 중추신경계의 전령물질로서 인식되어 왔다²⁷⁾. NO의 활성화는 NOS라는 중요한 합성단백질에 의존한다. CNS의 통증 발생과정에서의 역할을 포함하여 NO에 대한 많은 기능들이 증명되어져 왔다.

nNOS는 염증이 발생하면 활성화 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^{28,29)}. 염증의 급성기에 NO가 증가되었다는 것은 arginine의 이용이 증가되었다는 것 뿐만 아니라 NOS의 활성화와 발현, 및 NADPH-diaphorase의 활성이 증가되었다는 가리킨다²⁹⁾. 발바닥내 formalin을 주입하여 발생한 hyperalgesia에서 nNOS의 역할이 보고되었다^{30,31)}. 만성 관절염에서 NADPH-diaphorase의 활성이 증가되어 NO가 더욱 빠르게 증가될 수 있지만, nNOS이 발현이 증가되려면

염증이 유발된 후 적어도 6시간이 지나야만 한다²⁹⁾.

CFA에 의해 관절염이 유발되면 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 neuropeptides를 방출시킨다³²⁾. 더 자세히 살펴보면, CNS에서 NO는 NMDA 수용체와 밀접한 관계에 있다. 내인성 glutamate에 의해 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체가 활성화되면 중추 신경세포내로 칼슘이 유입되어 nNOS를 활성화시키고 NO가 방출되게 되는데, NO는 또한 cGMP를 증가시켜 guanylyl cyclase를 활성화시킨다²⁷⁾. 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 시냅스 후 신경전달물질 수용체에 달려 있을 뿐만 아니라, 전압 의존성 칼슘이온통로를 통해 칼슘이온의 유입을 유도하는 시냅스 전 신경의 활동전위에 달려있다. 그러므로 CFA 유발성 관절염은 primary afferent에서 지속적인 자극에 의해 지속적인 칼슘이온 유입과 NO를 생성시킬 수 있는 만성 염증모델

이다. 이러한 변화는 시냅스 전달을 가능하게 하며, central sensitization 및 hyperalgesia와 같은 현상으로 나타난다.

전술한 바와 같이, NMDA 수용체는 central sensitization과 secondary hyperalgesia의 발생에 반드시 필요하다³³⁾. 또한 이들은 CFA³⁴⁾나 carrageenan^{35,36)}, formalin^{30,31,37)}에 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 중추기전에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 나타낸다³⁸⁾. 또한 말초성 염증에 의해 유발되는 allodynia와 thermal hyperalgesia 및 central sensitization의 발생에 NO가 중요한 역할을 하고 있다는 증거도 있다³⁹⁾. Kaolin과 carrageenan을 슬관절내 주입하여 유발된 급성 관절염 모델에서 비특이적 NOS 억제제인 L-NAME를 관절강내 주입한 결과 heat hyperalgesia를 완벽하게 억제시킬 수 있었으며, 슬관절의 부종 및 발열의 증가를 막을 수 있었다⁴⁰⁾.

본 연구는 CFA의 관절강내 주입에 의해 유발된 만성 관절염 모델의 척수에서 nNOS 단백질의 발현을 분석한 결과, 이전에 연구된 결과들과 마찬가지로 척수에서 nNOS의 발현이 현저하게 증가되는 결과를 얻었다. 이 모델에 大羌活湯을 투여하여 관절염에 의해 증가된 척수의 nNOS에 대한 이들의 효과를 분석한 결과, 大羌活湯은 척수에서 염증에 의해 증가된 NO 및 nNOS를 유의성있게 감소시켰다. 만성 관절염에서 척수의 NO 및 nNOS 증가는 염증에 의해 통증이 발

생한 것을 의미하며, 염증에 의해 증가된 NO 및 nNOS 단백질의 발현이 감소되었다는 것은 만성 관절염 모델에서 大羌活湯이 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다. 만성 관절염에 의해 척수에서 증가된 NO가 大羌活湯의 투여에 의해 감소된 것으로부터 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 nNOS의 발현이 大羌活湯에 의해 감소되었지만, 이러한 치료들이 nNOS mRNA에까지 영향을 미치지 않아 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 기능⁴¹⁾ 뿐만 아니라 탐지할 수 있는 NOS의 양에 있어서 장기간의 변화를 초래한다. 슬관절염이 유발된 후 척수에서 nNOS가 3일째부터 유의성있게 증가되기 시작하여 14일째 가장 최고로 증가하며 그 후로 점차 감소한다고 하는데²⁶⁾, 이러한 실험결과는 NO에 의해 발현된 c-fos가 nNOS의 양을 장기간 동안 변화시킬 수 있음을 나타내는 것이다. 본 연구의 CFA 유발성 슬관절염 모델에서 大羌活湯이 염증에 의해 증가된 c-fos를 억제시킬 수 있는지는 더욱 더 연구해야 할 것이다.

iNOS는 칼슘 비의존성으로 원래 사이토카인에 의해 자극된 대식세포에서 발견되며, 다른

두 형태의 NOS보다 염증과 더욱 밀접한 관계에 있다. 독성을 나타낼 수 있는 양의 NO를 생산할 수 있는 NOS가 바로 iNOS이다. Adjuvant 유도성 관절염 동물에서 iNOS에 대한 immunoreactivity가 synovial tissue에서 나타난다고 한다⁴²⁾. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine과 N-iminoethyl-L-lysine은 adjuvant 관절염과 관련된 혈장 및 관절액에서 nitrite를 농도 의존적으로 억제시킬 수 있었다. iNOS는 또한 central sensitization과 관련있다고 증명되었다. iNOS 선택적 억제제는 발바다내 Zymosan을 주입하여 발생한 thermal hyperalgesia를 농도 의존적으로 억제할 수 있다⁴³⁾. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine은 thermal hyperalgesia를 차단시킬 수 있다⁴⁴⁾. 척수에서 iNOS는 정상 동물 및 adjuvant 관절염 동물에서 ependymal cell layer와 central canal 주위에 있는 ependymal cell의 process에 분포하고 있다고 보고되었다²⁶⁾. Ependymal cell은 CNS에 있는 glial cell의 일종으로, 면역 및 염증반응에 관여한다. Hyperalgesia를 발생시키는 많은 말초 자극들은 사이토카인과 같은 가용성 신호전달물질을 방출하여 척수나 뇌에 종결하고 있는 말초신경을 활성화시킨다. 말초 자극은 척수에서 glial cell들을 활성화시킬 수 있다⁴⁵⁾. 척수의 glial cell은 사이토카인, NMDA 효현제, NO를 방출시킬 수 있다⁴⁴⁾. iNOS의 발현은 주로 전사단계에서 조절된다. 그러므로 말초염증이 있으면 이러한 인자들은 말초 뿐만 아니라 CNS에 있는 iNOS의 발현에 영향을 미칠 수 있다. Central canal을 둘러싸고 있는 부위는 serotonin⁴⁶⁾, SP^{47,48)}, glutamic acid decarboxylase⁴⁹⁾, vasoactive intestinal polypeptide⁵⁰⁾, calcitonin gene-related peptide⁵¹⁾와 같은 여러 신경화학물질들을 유의성 있는 농도로 함유하고 있는 곳이다.

Ependymal cell들은 central canal 근처에서 방출되는 물질에 의해 활성화된 후 iNOS를 상향 조절한다.

본 연구는 만성 슬관절염을 유발한 후 大羌活湯을 매일 준 실험군, 마취만 처치한 대조군에서 척수의 iNOS 발현양을 분석하였다. 그 결과 정상 동물들에 비해 마취만 처치한 관절염 동물의 척수에서의 iNOS가 유의성 있게 증가되었으며, 大羌活湯을 5일간 1일 1회 실시한 실험군은 관절염으로 인해 척수에서 증가된 iNOS를 유의성 있게 억제시켰다. 만성 관절염에서 척수의 iNOS 증가는 염증에 의해 central sensitization 및 hyperalgesia가 발생하였다는 것을 의미하며, 大羌活湯을 투여한 후 염증에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현이 감소되었다는 것은 만성 관절염 모델에서 大羌活湯이 위의 두 과정을 억제함으로써 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

교세포는 CNS를 지지해주는 역할을 하고 있지만 glutamate에 반응을 할 수 있게 하고 NO를 합성할 수 있다. 여기서 glutamate는 nNOS를 활성화시켜 NO를 생성시킬 수 있는 물질로서 iNOS와 nNOS의 발현에 공통적으로 관여하는 물질이다. 大羌活湯이 관절염모델에서 glutamate를 억제시킬 수 있다면 iNOS와 nNOS의 억제현상을 동시에 설명하는 것이 가능할 것이다. 이것 또한 차후 실험을 해서 밝혀야 할 사항이다. 이 이외에도 大羌活湯이 관절염에 의해 증가된 iNOS를 억제시키는 기전에 대해서는 더 연구를 해야 할 것이다. 그리고 만성 슬관절염이 유도된 후 슬관절에 병리학적 변화가 생기는 데^{42,52)}, 이러한 치료들이 슬관절에 병리변화에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 더욱 연구가 되어야 한다.

NO는 CFA 유발 슬관절염 모델에서 말초 염

증에 의해 발생한 central sensitization 및 hyperalgesia와 밀접하게 관련되어 있다고 전술하였다. iNOS와 nNOS는 각각 다른 기전을 통하여 NO 합성에 기여하고 있다. iNOS와 nNOS를 차단하면 CFA 슬관절염에서의 통증을 막거나 제거할 수 있을 것이며, 이는 임상에서의 류마티스 관절염에도 적용되는 것이다.

CFA 유발 슬관절염 동물모델의 척수에서 관절염에 의해 증가된 NO에 대해 大羌活湯이 미치는 영향을 알아본 결과, 大羌活湯이 관절염에 의해 증가된 NO를 억제시킬 수 있으며, 만성 관절염에서 大羌活湯의 진통작용은 NO와 관련이 있음을 알 수 있었다. 그리고 척수에서 iNOS 단백질을 분석한 결과, CFA 유발 슬관절염에서 大羌活湯이 관절염에 의해 증가된 iNOS를 억제시키며, 이는 만성 관절염에서 大羌活湯의 진통작용은 iNOS와 관련이 있음을 알 수 있었다. 그리고 척수에서 nNOS 단백질을 분석한 결과, CFA 유발 슬관절염에서 大羌活湯이 관절염에 의해 증가된 nNOS를 억제시키며, 이는 만성 관절염에서 大羌活湯의 진통작용은 nNOS와 관련이 있음을 알 수 있었다.

관절염으로 증가된 iNOS 및 nNOS를 억제시키는 大羌活湯은 이러한 치료가 만성 슬관절염을 치료하는 유용한 치료법이 될 수 있음을 시사하는 것이며 또한 이러한 결과들은 류마티스 관절염으로 고생하는 환자들에게 하나의 치료방법으로 이용할 수 있음을 실험적으로 입증하는 것이다.

V. 結 論

본 연구에서는 류마티스 관절염 동물모델에서 大羌活湯이 관절염에 의해 유발된 통증으로 인한 행동감소에 미치는 효과와 척수에서 통증지표 중 하나인 NO 생성 및 iNOS, nNOS 발현양

상에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 만성 통증으로서 CFA 유발 관절염이 있는 동물모델에서 大羌活湯은 운동성에 유의한 개선을 보여주었으며, 이러한 진통효과는 적어도 2시간 정도 유지되었다.
2. CFA 유발 관절염이 있는 동물모델에서 大羌活湯은 농도 의존적으로 진통효과를 발휘하였다.
3. 大羌活湯은 CFA 유발 관절염이 있는 동물모델의 척수에서 증가된 NO의 양을 감소시켰다.
4. CFA 유발 관절염이 있는 동물모델의 척수에서 증가된 iNOS, nNOS 발현이 大羌活湯으로 인해 유의하게 감소되었다.

본 연구의 결과들은 만성 슬관절염 모델에 있어서 大羌活湯의 진통효과를 나타내며, 大羌活湯의 진통기전에 대해서는 NO계 외에 더욱 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의 학사. 1993 : 151, 156, 162, 175.
2. 이문호. 내과학. 서울 : 학림사. 1986 : 1695.
3. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 8.
4. 嚴用和. 重訂嚴氏濟生方. 北京 : 人民衛生出版社. 1980 : 48.
5. 임준규. 東西醫學協診과 臨床實際. 서울 : 輪成社. 1995 : 260.
6. 임준규, 신현대. 東醫物理療法科學. 서울 : 高文社. 1986 : 268-70.
7. 全國韓醫科大學 再活醫學科教室. 東醫再活醫學科學. 서울 : 書苑堂. 1995 : 95-6, 111-6.

8. 譚日強編. 金匱要略淺述. 北京 : 人民衛生出版社. 1980 : 75-92.
9. 羅天益. 衛生寶鑑. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 370-1.
10. 周命新. 醫門寶鑑. 서울 : 一中社. 1990 : 224-5.
11. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울 : 南山堂. 1986 : 125-6.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1983 : 372.
13. 樓全善. 醫學綱目(券2). 台南 : 北一出版社. 1978 : 7-8.
14. 王肯堂. 六科准繩(類方). 서울 : 翰成社. 1982 : 320.
15. 李昊根. 大羌活湯이 제II형 Collagen誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院 韓醫學碩士學位論文. 1994.
16. 金度植. 大羌活湯의 消炎·鎮痛작용에 관한 研究. 朝鮮大學校大學院 藥學科碩士學位論文. 1992.
17. 申鉉大. 大羌活湯의 利尿, 鎮痛 및 消炎效果에 관한 研究. 慶熙大學校大學院 韓醫學博士學位論文. 1982.
18. Colpaert FC. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. Pain. 1987 ; 28 : 201-22.
19. 김동환. 한냉치료가 급성 류마티스 관절염 환자의 염증완화에 미치는 효과. 대구대학교 재 활과학대학원. 2000.
20. 張介賓. 張氏類經. 서울 : 書苑堂. 1977 : 375.
21. 洪元植. 校合編纂 精校黃帝內經. 서울 : 東洋醫學研究院. 1981 : 28, 86, 102.
22. Mapp PI, Walsh DA, Garrett NE, Kidd BL, Cruwys SC, Polak JM, Blake DR. Effect of three animal models of inflammation on nerve fibres in the synovium. Ann Rheum Dis. 1994 ; 53 : 240-6.

23. Donaldson LF, Seckl JR, Mcqueen DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat-effects of adjuvant dose. *J Neurosci Methods*. 1993 ; 49 : 5-10.
24. Besson J-M, Guilbaud G. The arthritic rat as a model of clinical pain. Amsterdam : Excerpta Medica. 1988.
25. Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P. Relations between functional, inflammatory and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol*. 1997 ; 273 : R1550-6.
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. Solodkin A, Trauband RJ, Gebhart GF. Unilateral hindpaw inflammation produces a bilateral increase in NADPH-diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neurosci*. 1992 ; 51 : 495-9.
29. Traub RJ, Solobkin A, Meller ST, Gebhart GF. Spina 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. 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.
- 31.Coderre TJ, Yashpal K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur J Neurosci*. 1994 ; 6 : 1328-34.
32. Woolf CJ. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth*. 1989 ; 63 : 139-46.
33. 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.
34. Ren K, Hylden JLK, Williams GM, Ruda MA, Dubner R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain*. 1992 ; 50 : 331-44.
35. Ren K, Williams GM, Hylden JLK, Ruda MA, Dubner R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectivity attenuates carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1992 ; 219 : 235-43.
36. Sluka KA, Westlund KN. Centrally administered non-NMDA but not NMDA receptor antagonists block peripheral knee joint

- swelling. *Pain*. 1993 ; 55 : 217-25.
37. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain*. 1991 ; 44 : 179-85.
 38. Lam HH, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett*. 1996 ; 210 : 201-4.
 39. Yang LC, Masala M, Ysksh TL. Characterization of time course of spinal cord amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation : a chronic microdialysis study. *Pain*. 1996 ; 67 : 345-54.
 40. 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.
 41. Herdegen T, Brecht S, Mayer B, Leah J, Kummer W. Long-lasting expression of JUN and KROX transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain following axotomy. *J Neurosci*. 1993 ; 13 : 4130-45.
 42. 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.
 43. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain*. 1991 ; 44 : 179-85.
 44. Meller ST, Dykstra C, Grzynbycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacol*. 1994 ; 33 : 1471-8.
 45. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) on lumbar spinal cord increases following sciatic nerve constriction injury. *Brain Res*. 1991 ; 565 : 1-7.
 46. Lamotte CC, Johns DR, Lanerolle NC de. Immunohistochemical evidences of indolamine neurons in monkey spinal cord. *J Comp Neurol*. 1982 ; 206 : 359-70.
 47. Tessler A, Glazer E, Artymyshyn R, Murray M and Goldberg ME. Recovery of substance P in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral denervation. *Brain Res*. 1980 ; 191 : 459-70.
 48. Oldfield BJ, Sheppard A, Nilaver G. A study of the substance P innervation of the intermediate zone of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol*. 1985 ; 236 : 127-40.
 49. Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res*. 1982 ; 238 : 305-28.
 50. LaMotte CC. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons

- of the monkey and cat spinal central canal. *J Comp Neurol.* 1987 ; 258 : 527-41.
51. Chung K, Lee WT, Carlton SM. The effect of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett.* 1988 ; 90 : 27-32.
52. Evans CH. Nitric oxide : what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions.* 1995 ; [Suppl] 47 : 107-16.