

Adjuvant에 의해 유발된 關節炎 白鼠모델에 있어서 大防風湯의 진통효과

성병곤 · 박영일 · 김재주 · 김미선 · 김남권¹ · 임규상*

원광대학교 한의학전문대학원, 1:원광대학교 군포한방병원

Analgesic Effect of Daebangpung-tang on a Rat Model of Adjuvant-induced Arthritis

Byung Gon Sung, Young Il Park, Jae Ju Kim, Mi Sun Kim, Nam Kwen Kim¹, Kyu Sang Lim*

Professional graduate school of oriental medicine, Wonkwang University

1:Kunpo Medical Hospital, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

Daebangpung-tang(DBPT) 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 DBPT on a rat model of CFA-induced arthritis, which is not identical to human auto-immune arthritis although it does have many features in common with RA, and the relation between DBPT-induced analgesia and steroid hormones. CFA-induced arthritis rat model used to test the effect of DBPT 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, since oral injection of indomethacin produced temporary improvement of weight bearing. DBPT dissolved in water was orally administrated. After the treatment, behavioral tests measuring stepping force were periodically conducted during the next 4 hours. DBPT produced significant improvement of stepping force of the hindlimb affected by the arthritis lasting at least 3 hours. The magnitude of this improvement was equivalent to that obtained after an oral injection of 3mg/kg of indomethacin and this improvement of stepping force was interpreted as an analgesic effect. The reduced stepping force was divided into three stages(10-30g, 30-50g, and 50-70g). All experiments was performed at 50-70g of stepping force, since both DBPT and indomethacin showed the most excellent analgesic effect at 50-70g of stepping force. DBPT produced the improvement of stepping force of the affected hindlimb in a dose-dependent manner and showed analgesic effect on neuropathic pain as well. DBPT-induced analgesic effect could not be blocked by systemic injection of steroid antagonist mifepristone. The present study suggest 1) that DBPT produces a potent analgesic effect on the chronic knee arthritis pain model in the rat and 2) that steroids system does not mediate DBPT-induced analgesia.

Key words : Daebangpung-tang(大防風湯), arthritis(RA), analgesic effect, rat model, steroid.

서 론

류마티스 관절염은 병인이 알려지지 않은 자가면역질환의 일종으로서, 대부분의 환자들에게서 점진적인 인대파괴, 기형, 무능력, 조발사를 특징으로 한다. 류마티스 관절염 치료는 주로 스테로이드 호르몬을 보조제로 하면서 비스테로이드성 항염증제

(NSAIDs)를 사용하는 있다¹⁾. 이러한 약들은 일시적으로는 염증을 억제하면서 증상들을 개선시키지만, 장기간의 질병 치료에는 유의성 있는 개선을 보여주지 못하고 있다²⁾. 더욱이 NSAIDs로 장기간 치료를 하게 되면 소화성 궤양과 신기능 이상 등과 같은 심각한 부작용을 초래하게 된다³⁾. 이러한 단점들 때문에 더욱 효과적이고 안전한 치료방법이 요구되고 있다. 관절은 “諸筋者皆屬於筋”⁴⁾이라 하여 筋의 기능적 발현의 취합처이며 屈伸內外轉 및 回轉등을 담당하는 운동기관이고, 관절의 염증성 질환인 관절염⁵⁾은 다양한 원인으로 인하여 관절부위의 疼痛, 腫脹, 硬直, 發

* 교신저자 : 임규상, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 부속 한방병원
E-mail : kslim@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6841
접수: 2001/12/16 · 수정: 2002/01/15 · 채택 : 2002/02/03

赤, 發熱, 運動障礙가 나타나는 질환이라 하였다⁶⁾. 이러한 관절염에 나타나는 염증을 억제하고 통증을 제거하기 위해 여러 가지 처방들을 이용하여 왔고, 임상에서는 체내에 광범위하게 또는 국소적으로 진통효과를 나타내기 위하여, 약물치료를 하면서 다양한 형태의 침치료를 병행하고 있다. 관절염을 치료하는 대표적인 처방으로 大防風湯, 大羌活湯, 獨活寄生湯, 牛膝湯등을 들 수 있다. 大防風湯은 宋代 <太平惠民和劑局方>⁷⁾에 수록된 처방으로 不能屈伸, 兩膝腫大而痛한 증상과 髀脛이 마르는 鶴膝風^{7,8)}, 氣血兩虛의 膝腫痛⁹⁾, 류마티스 관절염, 척수염, 산후혈관 전색으로 인한 下肢不用¹⁰⁾등을 치료하는데 응용되고 있다.

본 연구의 주된 논점은 1) 대방풍탕이 관절염으로 유발된 통증을 완화시킬 수 있는가, 2) 관절염에 진통효과가 있는 대방풍탕이 질병 특이성을 가지는가, 3) 관절염에서 대방풍탕은 steroid system과 관련이 있는가, 4) 대방풍탕은 질병을 빠르게 회복시킬 수 있는 진통촉진작용이 있는가이다. 이 연구는 인간의 류마티스 관절염과 유사한 병리적 특성을 나타내는 complete Freund's adjuvant(CFA) 유도성 관절염 백서모델¹¹⁾에 대방풍탕을 투여한 후 위와 같은 논점들을 밝힘으로써 대방풍탕의 진통작용을 실험적으로 입증하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약재

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley(6주령, 관절염 및 염좌동물모델, 170-190g ; 신경병증 통증 동물모델, 150-170g)가 사용되었으며, 원광대학교 한의화전대학원에서 사육되었다. 동물은 온도 22±1℃, 상대습도 55±10%의 조건에서 12시간 주야로 주기를 바꿔주면서 한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 약재는 원광대학교 한의과대학 의산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다. 처방은 방약합편에 준하였고 그 내용(1첩기준)은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Daebangpung-tang

한약명	생약명	용량(g)
속지황	Rhizoma Rehmanniae	6g
방풍	Radix Ledebouriiellae	4g
당귀	Radix Angelicae Gigantis	4g
백작약	Radix Paeoniae Lactiflorae	4g
두충	Cortex Eucommiae	4g
황기	Radix Astragali	4g
부자	Radix Aconitii	2g
천궁	Rhizoma Cnidii	2g
우슬	Radix Achyranthis	2g
강활	Radix Osterici Koreani	2g
인삼	Radix Ginseng	2g
감초	Radix Glycyrrhizae	2g
총량		38g

3. 대방풍탕 추출물 조제

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

4. 관절염 모델 유도

만성관절염은 Enflurane(Ilsung pharmaceuticals, Seoul, Korea)과 O₂로 혼합된 마취상태에서 쥐의 오른쪽 무릎 관절강 내로 125µl의 Complete Freund's adjuvant(CFA, 250µg의 heat-killed Mycobacterium butyricum 함유)를 주입하여 유발시켰다. CFA는 Incomplete Freund's Adjuvant(Difco, Detroit, MI, USA) 4ml에 Mycobacterium butyricum(Difco, Detroit, MI, USA) 16mg을 용해시킨 후 saline 4ml과 혼합하여 만들었으며, 사용시 잘 혼합하여 주입하였다. 주입 후 마취를 중단하였으며, 수술 받은 쥐들은 무도 5~10분내에 마취에서 회복되었다.

5. Neuropathic pain 모델 유도

Enflurane과 O₂로 혼합된 가스 마취상태하에서 쥐를 prone position으로 놓고 L4-S2 level에 있는 왼쪽 spinous process들 주위에 있는 근육들을 제거하였다. 작은 분자로 왼쪽 L5 transverse process를 조심스럽게 제거하여 L5 척수신경이 잘 보이도록 한다. 왼쪽 L5 척수신경을 isolation하여 6-0 silk thread로 단단하게 묶은 후, 절개한 부분을 봉합하였다. 수술된 쥐는 수술전과 똑같은 조건에서 사육되었다.

6. 관절염모델 동물행동 테스트

각 실험군들은 긴 통로의 한가운데에 한쪽으로 치우쳐져 놓여 있는 저울 위로 자연스럽게 걸어가는 과정에서 오른쪽 발이 디디는 압력을 측정함으로써 관찰되었다. 검은색의 얇은 판넬로 만들어진 통로를 만들어 놓고 통로의 한가운데에 저울을 위치하여 놓았다. 저울은 쥐가 앞으로 걸어가는 방향의 오른쪽으로 치우치게 위치해 놓으므로써 한쪽 발만이 저울위로 걸어가게 해 놓았다. 모든 테스트는 관절염 및 염좌 유도 전의 무게 및 왼쪽 발의 누르는 압력을 측정하였으며, 약물 처치 후 1시간, 2시간, 3시간, 4시간째에 측정되었다. 관절염 모델 동물의 foot stepping force 역치에 대한 Time Course는 관절염 유도 후 24시간마다 측정하여 552시간째까지 관찰하였다. 모든 테스트는 각 시간마다 2회 실시하여 평균값을 취하되, 2회 실시한 두 값이 10g 이상 차이가 날 때는 1회 더 실시하여 서로 가까운 두 값을 평균내어 측정값으로 함을 원칙으로 하였다. 또한 한 동물이 여러 처치를 받도록 하는 paired test를 하였고, 처치 및 테스트는 무작위로 하되 single-blind로 시행하였다.

7. Neuropathic pain 모델 동물행동 테스트

각 동물들은 up down 방법을 사용하여 von Frey filament의 기계적 자극에 대한 foot withdrawal threshold로 측정되었

다. 테스트를 위해 쥐의 발바닥에 매우 쉽게 접근할 수 있도록 만들어진 금속철망바닥(3×3mm, 철망의 각 구멍크기)의 위에 transparent plastic box를 놓고 각 동물들을 각각 상자 안에 들여 놓는다. 대략 0.22정도로 logarithmic하게 증가하는 bending forces를 갖는 8개의 von Frey filaments(von Frey 숫자들, 3.65, 3.87, 4.10, 4.31, 4.52, 4.74, 4.92, 5.16 ; 각 숫자들은 다음의 값에 상응한다. 0.45, 0.74, 1.26, 2.04, 3.31, 5.50, 8.32, 14.45g)가 선택되었다. 테스트는 filament들의 중간 숫자들 중 하나인 4.31부터 시작한다. Von Frey filament는 ligation한 쪽과 동측인 왼쪽 발바닥의 세 번째 혹은 네 번째 발가락의 ventral surface에 밑에서부터 수직으로 올리도록 한다. 자극에 대해 양성적인 반응이 나타날 때마다 더 작은 Von Frey hair를 가지고 다음 테스트를 하고, 음성적인 반응이 일어날 때마다 더 높은 Von Frey hair를 가지고 다음 테스트를 시행한다.

테스트는 반응에 대해 첫 번째 변화를 얻은 Von Frey filament 값부터 시작하여 6회의 자극에 대한 반응을 얻을 때까지 계속하였다. 양성 또는 음성 반응들의 형태들은 Dixon(1980)에 의해 제시된 공식을 사용하여 50% 역치값으로 변환하였다: $50\% \text{ threshold} = 10(X + kd)/10^4$. 여기서 X는 로그단위로써 마지막 Von Frey filament 값을 가리키고, k는 1980년 Dixon에 의해 얻어진 양성/음성 반응들의 형태에 대한 tabular value이며, d는 로그단위(0.22)에서 자극들간의 편차이다. 자극 범주내에서 양성 혹은 음성반응만 일관되게 관찰된 경우, 그 값은 각각 0.3g 또는 15g으로 설정했다. saturation value로서 15g을 설정한 이유는 더 강한 bending force를 가지는 Von frey filament를 적용시키면 쥐의 발을 바닥으로부터 밀어올리게 되고, 이렇게 되면 능동적인 foot withdrawal과 수동적인 foot lift를 구별하는데 어려움이 있기 때문이다. 동물들은 매회 테스트 하기 적어도 15분전에 테스트 환경에 적응하도록 플라스틱 상자에 넣어 놓았다. 쥐가 적응하면 baseline threshold를 측정하고, 실험적인 처치를 한 후 처치 후 1시간, 2시간, 3시간, 4시간째에 행동테스트를 시행하였다. 모든 약물처치는 한 동물에게 paired로 하였으며, 행동 테스트는 single-blind로 시행하였다.

8. 약물

Indomethacin(Sigma, St. Louis, MO)은 물에, mifepristone (Biomol. Research Labs., Inc.)은 0.5% methylcellulose(v/v in water)에 용해시켜 투여하였다. Steroid antagonist인 mifepristone은 20mg/kg의 농도로 복강 내 투여하였다. Indomethacin은 0.5mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg의 농도로 구강으로 투여하였다. 대방풍탕 추출물은 물에 용해시켜 구강으로 투여하였다.

9. 통계분석

데이터는 Mean±SEM으로 나타내었다. 통계검사는 Dunnett's post-hoc test에 의한 one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA)로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있다고 하였다. 단, 대방풍탕에 의해 발생된 진통의 측정작용에 대한 통계검사는 t-test로 하였다.

결 과

1. 관절염 모델에서 대방풍탕의 진통 효과

실험군은 자극 후 1시간(FSF; 73.75±2.07666g), 2시간(FSF; 72.375±2.31985g), 3시간(FSF; 69.75±2.6959g)에 baseline value (FSF; 62.875±2.78989g)에 비해 손상 받은 무릎과 동측 하지의 FSF가 유의성있게 개선되었다. 대조군은 실험하는 4시간동안 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 실험군은 1시간째 stepping force의 변화가 가장 높았으며, 시간이 지남에 따라 점차 감소하기 시작하였고, 대방풍탕의 진통효과는 적어도 3시간정도 유지되었다.

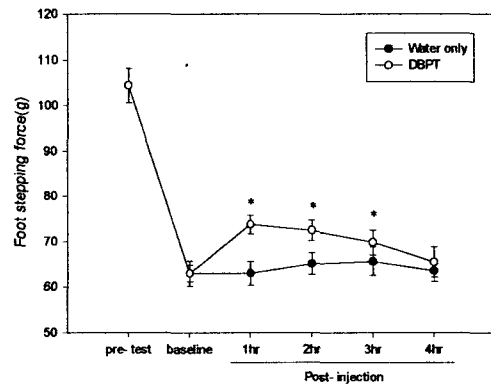


Fig 1. Effect of DBPT on reduced foot stepping force in a CFA-induced arthritic rats. DBPT 2.5g/kg(500mg/ml, 1ml/200g rat) or water was orally injected to rats. In 8 rats with arthritis, water only and DBPT dissolved in water were applied for 2 days from 9th day (about 60g of stepping force of the affected 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 (p<0.05) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

2. 관절염 모델에 대한 인도메타신의 진통효과

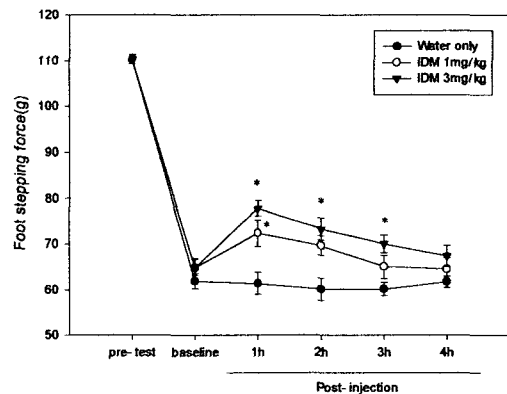


Fig 2. Effect of Indomethacin on reduced FSF after the induction of arthritis. Indomethacin 1mg/kg and 3mg/kg were orally administrated. In 8 rats with arthritis, only water and indomethacin 1mg/kg and 3mg/kg dissolved in water were applied for 3 days from 9th day (about 60g of stepping force of the 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 baseline value (p<0.05) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

인도메타신 1mg/kg이 투여된 실험군은 투여 후 1시간(FSF; 72.375±2.909g)에 baseline value(FSF; 64.688±2.138g)에 비해 손

상반은 무릎과 동측하지의 FSF가 유의성있게 개선되었다. 인도메타신 3mg/kg이 투여된 실험군은 투여 후 1시간(FSF; 77.813 ± 1.6635g), 2시간(FSF; 73.25 ± 2.4911g), 3시간(FSF; 70 ± 1.9273g)에 baseline value(FSF; 64.813 ± 1.7138g)에 비해 손상받은 무릎과 동측하지의 FSF가 유의성있게 개선되었다. 대조군은 실험하는 4시간동안 유의성있는 변화를 나타내지 않았다. 두 실험군 모두 투여 후 1시간에 FSF의 변화가 가장 높았으며, 그 후 시간이 지날수록 FSF가 점차 감소하는 경향을 보였다. 예비실험에서 인도메타신 0.5mg/kg을 투여한 결과, 어떠한 유의성있는 변화도 나타나지 않았다.

3. 신경병증 통증 동물모델에 있어서 대방풍탕의 진통효과

수술에 의해 영향을 받은 왼쪽 발가락의 기계적 민감성에 대한 대방풍탕의 효과를 측정하기 위하여 대방풍탕 2.5mg/kg을 구강으로 투여한 결과, 처치 후 1시간(Von Frey(VF) value, 3.88688 ± 0.1301 ; gram value, 0.77069g), 2시간(VF value, 3.73313 ± 0.10002 ; gram value, 0.54092g)에 baseline value(VF value, 3.42575 ± 0.14052 ; gram value, 0.26653g)에 비해 기계적 역치가 유의성있게 증가하였으며, 대조군은 실험하는 4시간동안 유의성있는 변화를 일으키지 않았다.

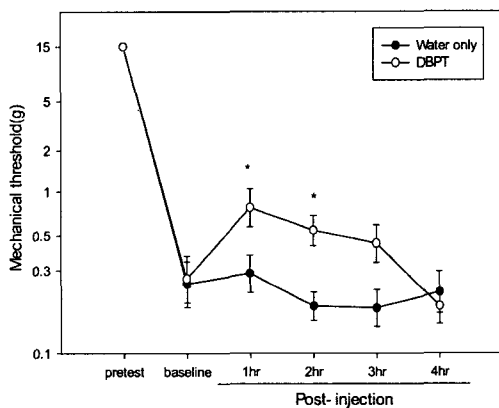


Fig 3. Effect of DBPT on the mechanical sensitivity of the foot in neuropathic rats. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation and developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery(baseline) as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value(pretest). In 8 rats with neuropathic pain, water only and DBPT dissolved in water were applied 3days after operation in random order and single-blind. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value(p<0.05) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

4. 관절염 모델에 있어서 대방풍탕의 농도에 따른 진통효과

실험군은 0.5g/kg, 1.5g/kg, 2.5g/kg, 5g/kg 농도의 대방풍탕을 구강으로 투여하였고, 대조군은 물을 구강으로 투여하였다. 대방풍탕 0.5g/kg을 투여한 실험군 및 물을 투여한 대조군은 감소된 weight bearing에 대해 유의성있는 개선을 보여주지 못했다. 대방풍탕 1.5g/kg, 2.5g/kg, 5g/kg을 투여한 실험군은 관절염에 의해 감소된 weight bearing을 유의성있게 개선시켰으며, 그 효과 또한 농도의존적으로 나타났다. 본 실험에서 다른 치료약과 효과를 비교하기 위한 대방풍탕의 농도는 2.5g/kg으로 정하였다. 그 이유는 대방풍탕 5g/kg의 농도는 다른 한약추출물보

다 대방풍탕이 물에 더 많이 녹아서 만들 수 있었던 농도이며(보통 다른 한약제는 200g의 쥐를 기준으로 하여 500mg/ml의 농도로 1ml투여하면 결국2.5g/kg의 농도를 투여하는 셈인데, 500mg/ml이 만들 수 있는 일반적인 최대 농도이다), 또한 대방풍탕 2.5mg/kg은 인도메타신 3mg/kg의 진통효과와 비슷한 결과가 나오는 농도였기 때문이다.

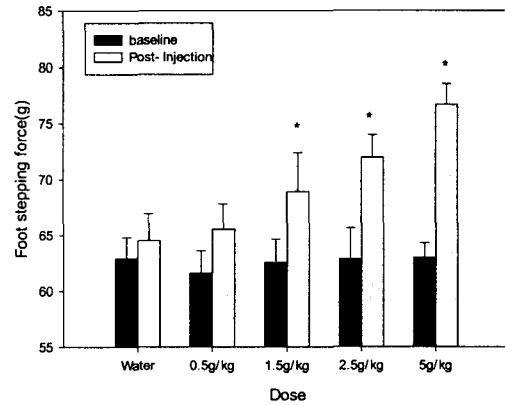


Fig 4. Analgesic effects produced by graded doses of DBPT on stepping force of the limb reduced by CFA-induced arthritis. In 8 rats with arthritis, water only and several doses of DBPT dissolved in water were applied for 5 days from 8th day (about 55g of stepping force of the affected limb) after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner. Post-injection values were calculated by averaging the responses at the 1st, 2nd, and 3rd hour after an injection of BDPT or water. Asterisks indicate values significantly (p<0.05) different from the pre-treatment baseline value by one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test. Statistical analysis was done with preoperative value, baseline value, mean value of 1h, 2h and 3h values, 4h value.

5. CFA 유도성 관절염 수술 전후의 하지의 Weight Bearing 변화

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유발된 만성관절염 모델에서 수술 전 및 수술 후 24일동안 오른쪽 하지의 weight bearing 변화를 측정하였다. 관절염 유도 후 15일째까지는 매일 측정하였으나 figure에는 홀수날만 나타냈으며, 15일 이후에는 3일마다 측정하였다. 수술받은 무릎과 동측 발의 Stepping force가 수술 후 몇 시간 후부터 유의성 있게 감소되는지는 테스트하지 않았으나 수술 후 24시간에는 stepping force가 0까지 감소되었으며 이틀째부터 점차적으로 회복되기 시작하여 18일째까지는 수술전에 비해 유의성 있게 감소된 상태를 유지하다가 수술 후 24일째에는 거의 회복되었다. 우리는 만성 슬관절염이 유도된 후 관절염이 유도된 환측하지의 감소된 체중지탱현상에 대해 슬관절의 염증성 통증 때문에 관절염이 유도된 환측 하지로 자신의 체중을 지탱하지 않으려고 하기 때문인 것으로 추론했다.

그러므로 우리는 foot stepping의 감소된 양을 관절염에 의해 발생한 통증계수로 사용하였다. 감소된 foot stepping force를 슬관절염 통증계수로 사용하는 것에 대한 타당성을 평가하기 위해서, 우리는 인도메타신을 구강투여하여 stepping force에 대한 효과를 측정하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이, 슬관절염이 유도된 동측하지의 감소된 stepping force는 인도메타신 3mg/kg의 구강투여 후 상당히 회복되었으며 그 효과는 적어도 3시간까지 지속되었다. 인도메타신의 효과는 관절염이 유도된 하지가 무게를 더 지탱할 수 있게 하였기 때문에 진통효과로서 해석할 수 있

다. 그러므로 감소된 foot stepping force가 인도메타신에 의해 회복되었다는 것은 foot stepping force를 측정하여 슬관절염의 통증계수로 사용할 수 있다는 것을 의미한다.

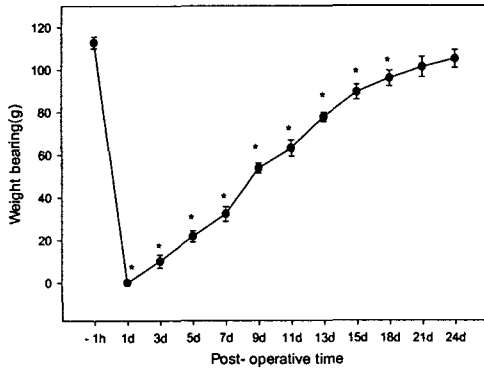


Fig 5. Change in weight bearing of the limb before and after CFA-induced arthritis. Animals were subjected to the injection of CFA into the knee joint on the left side of rats. All animals showed a reduced stepping force of the ipsilateral limb of the knee affected by arthritis from 1 day after the induction of arthritis as evidenced by a dramatic lowering of foot stepping force when compared to the preoperative value(-1h value). This figure shows average values(±SEM) of foot stepping force of the affected hindlimb in a group of 8 rats one hour before and at various days for 24 days after induction of arthritis. Post-operative time is expressed as h for hours and d for days. Asterisks indicate values significantly different ($p<0.05$) from the preoperative value (-1h) by the one-way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test.

6. CFA 유도성 관절염에서 FSF의 정도에 따른 대방풍탕과 인도메타신의 진통효과

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유도된 관절염 모델에서 감소된 stepping force가 회복되는 단계를 3단계로 나누어 각 단계에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 전침 및 인도메타신의 효과를 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 슬관절염에 의해 감소된 weight bearing은 figure 5에서 보는 바와 같이 18일동안 유의성있게 감소되어 있는데, foot stepping force를 10-30g, 30-50g, 50-70g으로 크게 나누어 각각 stepping force가 대략 20g, 40g, 60g 부근일 때 실험을 시작하였으며 실험하는 도중 각각 baseline 값이 한계범위를 넘지 않게 하였다. Stepping force 10g 이하와 70g 이상일 때는 실험에서 제외시켰는데, 그 이유는 10g이하에서는 통증의 정도가 너무 심하여 1회 처치 후 그 효과를 판단하는데 어려움이 있었고 70g 이상일때는 인도메타신 3mg/kg을 투여한 경우 수술전 값에 가깝게 개선이 되어서 혹 수술전 값과 처치전 baseline 값의 차이보다 더 개선될 수 있는 가능성이 간과될 수 있기 때문이다. 실험군은 인도메타신 1mg/kg 및 3mg/kg, 대방풍탕 2.5g/kg을 구강으로 투여하였고, 대조군은 물을 구강으로 투여한 것 외에는 어떠한 처치도 받지 않았다. 전침투여군, 인도메타신 투여군 모두 각 세 단계에서 유의성 있는 개선을 보여주었으며, 전침의 평균적인 진통효과는 인도메타신 1mg/kg의 효과와 비슷했다. 전반적으로 볼 때 stepping force가 50-70g일 때가 다른 두 단계보다 전침 및 인도메타신의 효과보다 더 차이가 있게 나왔기 때문에, 만성 관절염이 유도된 후 진통효과 테스트는 stepping force가 60g 부근을 나타낼 때 시행하기로 하였다.

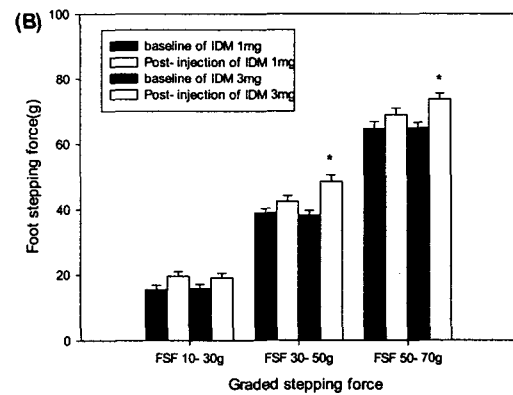
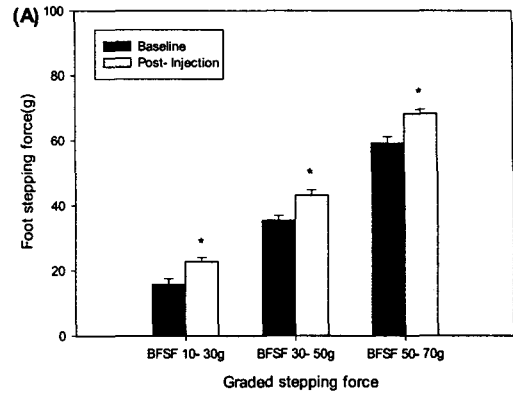


Fig 6. Analgesic effect of DBPT(A) and Indomethacin(B) on three stages of reduced stepping force of the affected limb after arthritis. DBPT 2.5g/kg(500mg/ml, 1ml/200g rat)(A) and Indomethacin 1mg/kg and 3mg/kg(B) with water control group were orally administrated. Control data was not expressed here. Each experiment was done with 8 rats so that 16 rats needed. In 8 rats of each experiment with arthritis, DBPT/CON experiment and IDM/CON experiment were separately applied for 2 or 3 days from each stage (about 20g, 40g, and 60g of stepping force of the affected limb) after the induction of arthritis in random order and a single-blind manner so that all 16 rats had each received all two or three treatments, using a different treatment on a different day in random sequence. Post-treatment or post-stimulus values were calculated by averaging the responses at the 1st, 2nd, and 3rd hour after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ($p<0.05$) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test. Statistical analysis was done with preoperative value, pre-treatment baseline value, mean value of 1h, 2h, and 3h values, 4h value. CON, control.

7. 만성관절염모델에 있어서 대방풍탕에 의해 발생된 진통작용의 측정효과

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유발된 관절염 모델에서 5일간 매일 대방풍탕을 투여하고 다음날 감소된 weight bearing을 측정하여 대방풍탕투여 후 발생한 진통작용에 의해 질병이 얼마나 더 빨리 회복되는지를 알아보기 위하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 실험군은 대방풍탕 투여 1시간 전에 처치전 값을 측정 후 대방풍탕을 구강으로 투여하였다. 대조군 또한 투여 1시간 전에 처치전 값을 측정 후 물을 구강으로 투여하였다. 관절염 유도 후 첫째날부터 5일째까지는 처치전 값을 측정 후 각각 대방풍탕 또는 물만 투여하였고, 실험 6일째는 처치전 값만 측정하였다. 그 결과, 실험군은 4일째(3번째 대방풍탕을 투여한 후 다음날)부터 물만 투여한 대조군에 비해 유의성 있게 weight bearing의 회복을 보여주었고, 6일째에는 대조군에 비해 2배정도 높은 회복을 보여 주었다.

고찰

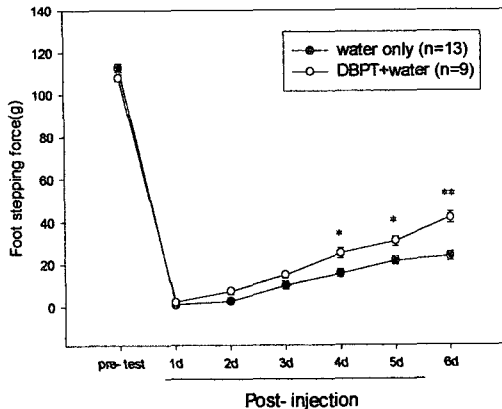


Fig 7. Change in weight bearing next day after the treatment of DBPT one time every day for 5 days in arthritis rats. Weight bearing for pre-treatment value was measured 1 hour before DBPT or water only. In each 8 rats with arthritis, water only and DBPT 2.5g/kg(500mg/ml, 1ml/200g rat) dissolved in water were applied at 9 o'clock every morning for 5 days from 1 day after the induction of arthritis. Asterisks indicate values significantly different from the same period values of control group by student t-test. * p<0.005, ** p<0.001

8. 關節염모델에서 대방풍탕의 진통작용에 대한 Mifepristone의 차단효과

CFA의 슬관절강내 주입에 의해 유발된 關節염 모델에서 환측하지의 감소된 weight bearing을 회복시키는 대방풍탕의 진통작용에 대한 Mifepristone의 차단효과를 실험하였다. <Mifepristone+대방풍탕> 및 <Vehicle+대방풍탕> 실험군은 대방풍탕을 투여하기 10분전에 스테로이드 길항제인 Mifepristone 20mg/kg 또는 vehicle을 복강으로 주입한 후 대방풍탕을 구강으로 투여하였다. Vehicle은 0.5% methylcellulose(v/v in water)으로 만들어 투여하였다. 그 결과, <Mifepristone+대방풍탕> 및 <Vehicle+대방풍탕> 실험군 모두 감소된 stepping force를 유의성있게 개선시켰으며, <Mifepristone+대방풍탕> 실험군은 그 효과가 적어도 2시간정도 유지되었고 <Vehicle+대방풍탕> 실험군은 적어도 3시간정도 유지되었다.

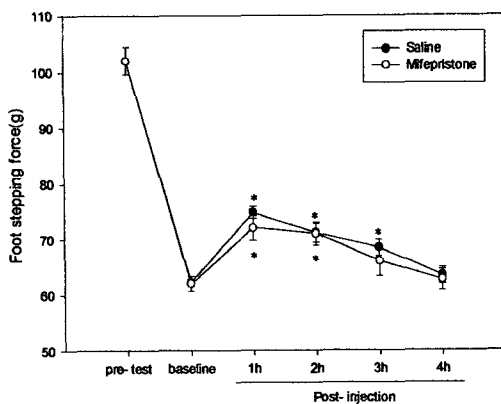


Fig 8. Effect of Mifepristone on DBPT-induced analgesia in arthritis. 8 rats were divided into 2 groups on random order and DBPT dissolved in water was applied to both groups 10minutes after the intraperitoneal injection of 20mg/kg mifepristone or vehicle in a single-blind manner. Experiment was applied for 2 days from 9th day (about 60g of stepping force of the affected limb) after the induction of arthritis. Asterisks indicate the values significantly different from the baseline value(p<0.05) by the one way repeated measure Analysis of Vanance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

류마티스관절염은 주로 관절 윤활강에 지속적인 염증을 야기하여 pannus에 의한 뼈의 파괴, 각종 cytokine에 의한 윤활 관절막염, 다양한 단백질분해효소, O₂ radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화 등으로 인하여 연골의 소실^{12,13}과 관절의 변형을 가져오는 원인불명의 만성 전신성 다발성 질환이다¹⁴. 특히 심한 경우 류마티스성 결정, 맥관염, 안염증, 신경기능이상, 심폐기능장애, 림프절병증, 비장종대등의 증상이 발현된다. 류마티스 관절염의 발병원인은 아직 불확실하나, 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있다. 즉, 윤활액내의 type II collagen 역가 증가¹⁵, collagenase의 증가¹⁶, prostagladins E2 증가¹⁷, stromelysin 및 plasminogen activator 증가¹⁸ 등이 보고되었다. 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과면역반응에 의해서 발생하게 되는데 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성 소염제(NSAIDs), 단순 소염제, 부신피질호르몬제, 면역억제제 및 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있으나¹⁹⁻²⁰, 골수억제, 고혈압, 간장 및 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용을 유발하여 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발이 필요한 실정이다. 한의학에서 류마티스관절염은 歷節風^{21,22,23-26,49,50,54-55}의 범주에 속하는 것으로, 白虎歷節風, 鶴膝風, 痛風, 痛痺, 痺證, 風痺, 白虎風, 走注疼痛등의 異名^{21,22,23-26}을 가지며 膝, 足, 肘, 腕, 手足關節 등에 극렬한 疼痛과 紅腫, 변형을 일으킬 수 있는 流走性疼痛疾患이다^{4,28-29}. 歷節風의 원인에 대하여 張³⁰이 疲勞, 汗出後風邪所致라 한 以後로 巢³¹는 “飲酒腠理開, 汗出當風所致也... 亦有氣血虛”라 하였으며, 以後 醫家들은 風寒濕邪의 感觸과 氣血虛弱, 肝腎虛²⁵ 등을 주된 원인으로 들고 있다. 고대 문헌을 인용하면 류마티스 관절염은 주로 痺證의 범주에 속한다^{27,32-34}. 痺證은 <黃帝內經>에 최초로 나타나는데, <素問 痺痛篇>³⁵에 “風寒濕三氣가 혼합되어 痺證이 되는데, 風氣가 勝할 때는 行痺가 되고, 寒氣가 勝할 때는 痛痺가 되고, 濕氣가 勝할 때는 着痺가 된다.”, “소위 痺라는 것은 風寒濕邪에 重感되어 발생한다.”, “飲食居處가 病의 근본이 된다.” 라고 하였다. 後代에는 痺證이 濕生熱, 혹은 風寒鬱熱로 인하여 身上如鼠走, 脣口反綻, 肌肉變色하게 된다 하였다³⁶. 痺證의 치료원칙으로서 宣通이 共通治法이 되고²⁷, 風寒濕熱의 邪氣에 대하여 각각 祛風, 散寒, 除濕, 清熱藥物을 적절히 배합하여 다스리는데, 痺證이 오래되어 瘀血과 痰濁이 생겨난 경우에는 活血藥物, 祛瘀藥物 및 搜風祛邪藥物을 함께 사용한다. 평소 체질이 허약하거나 혹은 久病으로 허약해진 경우에는 調補氣血, 補腎壯陽, 滋陰養肝하는 약물들을 응용하는데³⁷, 대표적인 처방이 大防風湯이다. 大防風湯은 宋代 <太平惠民和劑局方>²⁴에 수록된 처방으로 많은 醫家들에 의해 임상에 활용되었는데^{23,25,31,38}, 용량은 醫家에 따라 다소 다르나 약물구성은 거의 동일하다. 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃으로써 補血하고, 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草로써 補氣하고, 羌活, 防風으로써 散風濕, 利關節하며, 牛膝, 杜仲으로써 補腰膝하고, 附子로써 人蔘, 黃芪의 기운을 전신맥락에 行하게 하여 氣血兩虛에 風濕을 겸하여 나타난 痿痺不能行의 聖藥이 된다²³. 실제로 가장 많이 쓰여지는 임상서적중의 하나인 方藥合編³⁹에서 “대방풍탕은 鶴膝風을 치료하며

祛風, 順氣, 活血, 壯筋하며 만성관절류마티스, 脚氣, 筋肉麻痺, 膝眼痛, 育髓疾患, 半身不隨, 貧血, 產後脚氣, 小兒癱瘓, 下肢無力 등에 응용한다.” 라 하였고, 東醫寶鑑⁴⁰⁾에서는 “痢疾을 앓은 뒤에 다리가 아프며 마비되고 약해져서 잘 걷지 못하는 것을 痢風이라고 한다. 양 무릎이 붓고 몹시 아프며 넓적다리와 정강이가 여위어 피부와 뼈만 남아서 화의 다리 마디처럼 되고 가드라들었기 때문에 누워서도 구부렸다 폈다 하지 못하는 데는 대방풍탕을 쓴다” 라 하여 대표적인 관절염치료제로 설명하였다. 대방풍탕에 대한 최근의 연구결과로서 田⁴¹⁾의 보고에 의하면 대방풍탕은 혈관신생, 세포유착인자의 발현 및 운활세포의 과형성을 억제하였고, 그 결과 염증관련 면역연쇄의 차단, 섬유화 섬유모세포의 침착 비만세포 염증관여세포의 이주감소 등을 통해 관절염을 완화시키는 작용을 한다고 하였다. 또 崔⁴²⁾의 보고에 의하면 대방풍탕에 의한 정상 흰쥐의 조직학적 변화는 미비하나, 관절염유발군에서 일부 PAS반응을 보이는 조직학적 변화를 보인다고 보고하여 관절염치료의 가능성을 열어 두었다. 본 연구는 이러한 대방풍탕의 효능중 진통효과를 입증하기 위해 만성통증모델인 CFA 유도성 슬관절염 모델을 이용하였다. 관절통 및 관절염을 연구하기 위해서 실험실에서는 사람의 염증상태를 모방하여 다양한 동물모델을 이용하여 왔다^{43,44,45)}. CFA 유도성 관절염 모델은 인간의 류마티스관절염(RA)과 일치하지는 않지만 RA의 일반적인 특징을 많이 가지고 있기 때문에 실험실에서 많이 사용하는 동물모델로서 여러 편의 논문들이 이 모델이 만성통증을 나타냄을 이미 밝힌 바 있다^{46,47)}. 무릎 관절강내에 CFA를 편측으로 주입하면 수시간내에 주입한 쪽에 hyperalgesia가 발생하게 된다. 이러한 hyperalgesia는 adjuvant 주입 후 8주간이나 지속된다고 한다⁴⁸⁾. Adjuvant 유도성 관절염모델은 만성관절염에 대한 신약의 항염 및 진통작용을 분석하기 위해 광범위하게 이용되어지고 있다⁴⁶⁾.

본 논문에서는 CFA 주입으로 유발된 염증성 통증에 대한 계측기준(parameter)으로서 손상된 무릎의 동축 발이 디디는 압력의 변화를 측정하였다. 손상된 무릎의 동축 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 유도성 슬관절염 동물모델은 만성통증에 대한 대방풍탕의 진통기전을 연구하는데 유용할 것이다. 이러한 동물모델을 이용하여 관절염이 유발된 동물에게 대방풍탕을 구강으로 투여한 결과, 대방풍탕이 적어도 3시간동안 지속되는 진통효과를 발생시킨다는 것을 증명했다. 이러한 진통효과는 농도의존적으로 나타났다. 또한 대방풍탕은 만성 슬관절염 모델에서 뿐만 아니라 신경병증 통증모델에서도 2시간 정도 유지되는 진통효과를 보여주었다. 또한 대방풍탕의 진통효과는 Steroid System을 통해 발생하지는 않는 것 같았다. 비록 현 연구가 실험적 동물모델에서 대방풍탕의 효과를 명확하게 보여주고는 있지만, 그 진통효과의 기전은 불명확하다. 현 연구에서 우리는 Steroid receptor antagonist인 Mifepristone을 사용하여 대방풍탕의 진통작용에 미치는 Steroid system의 영향에 대해 실험하였다. 연구 결과, 대방풍탕에 의해 유발된 진통효과는 Mifepristone에 의해 완벽하게 차단되지는 않았다. 왜냐하면 대

방풍탕의 진통효과는 적어도 3시간 정도 유지되는데, Mifepristone 전처치군에서는 대방풍탕이 2시간정도 유지되는 진통효과를 보였기 때문이다. 이는 대방풍탕의 진통효과가 Steroid system과 관계가 없다고는 단언할 수 없으나 2시간정도 유지되는 효과로 보아 대방풍탕의 진통효과는 Steroid system에 의해 매개되지 않는다고 볼 수 있을 것 같다. 우리는 만성슬관절염 모델에서 대방풍탕의 진통효과를 측정하기 위하여 만성슬관절염의 발전단계를 3단계로 나누어 실험하였다. 즉 환축 하지의 stepping force를 10-30g, 30-50g, 50-70g 이 세 단계로 나누었다. 이 분류는 본 실험에 사용된 동물의 무게에 제한되어 사용되는 기준이다. 본 동물모델은 수술 후 18일째까지 환축하지의 stepping force(<95g)가 유의성 있게 감소되어 있었으며, Indomethacin이나 대방풍탕 투여 후 회복될 수 있는 stepping force를 감안하여 처치 전 stepping force를 70g 이하로 정하였다. 또한 stepping force가 10g이하일 때는 질병의 정도가 너무 심하기 때문에 10g 이상일 때만 실험하였다. 그래서 10g부터 70g 사이를 3단계로 나누어 10-30g, 30-50g, 50-70g으로 분류하게 된 것이다. 세 단계 모두에서 대방풍탕 및 Indomethacin을 처치하여 1시간, 2시간, 3시간의 평균효과를 측정한 결과, 대방풍탕은 세 단계에서 모두 유의성 있는 개선을 보여주었으며, Indomethacin은 1mg/kg에서는 유의성이 없었으나 3mg/kg에서는 stepping force가 30-50g일 때부터 유의성있는 개선을 보여주었는데, Indomethacin과 대방풍탕 모두 stepping force가 50-70g일 때 가장 뛰어난 개선효과를 보여주었기 때문에, 모든 실험을 stepping force가 50-70g일 때 실시하게 된 것이다. 한의학에서는 약을 써서 질병을 회복시키는 치료방법을 사용하여 왔다. 류마티스관절염 또한 예외는 아니다. 본 연구에서는 대방풍탕이 질병을 회복시키는 정도를 5일동안 실험하여 대방풍탕이 질병을 빠르게 회복시키는 작용이 있음을 증명하였다. 그러나 만성 슬관절염이 유도된 후 슬관절에 병리학적 변화가 생기는데^{52,53)}, 이러한 치료들이 슬관절의 병리변화에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 더욱 연구가 되어야 한다.

결 론

본 연구에서는 류마티스 관절염 동물모델에서 대방풍탕이 관절염에 의해 감소된 관절의 운동성에 미치는 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. CFA 유도성 관절염 백서에서 대방풍탕은 관절의 운동성을 유의성있게 개선시켰으며, 이러한 진통효과는 3시간정도 유지되었고 농도의존적이었다. 또한 대방풍탕 2.5g/kg의 효과는 인도메타신 3mg/kg의 효과와 비슷했다. 대방풍탕은 Neuropathic pain 백서모델에서도 2시간정도 유지되는 진통효과를 나타내었다. 대방풍탕의 진통효과는 스테로이드계에 의해 매개되지 않았다. 연속적인 대방풍탕 투여는 슬관절 운동성의 빠른 회복을 보여주었다.

이상의 결과들을 종합하면, 만성슬관절염 모델에 있어서 대방풍탕은 강력한 진통효과를 나타내며, 이러한 진통효과는 스테로이드계와 주로 관련이 없다고 추측된다. 또한 대방풍탕이 다른 만성통증에도 응용할 수 있는 가능성이 있음을 제시하는 것이다.

감사의 글

이 논문은 BK21 사업의 연구비와 2001년도 원광대학교 교내 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

참고문헌

- Campbell S. M. Rheumatoid arthritis : current strategies. *Hosp Med.* ; 34:29-32, 1988.
- Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol* .37:546-554, 1998.
- Pincus T, Marcum SB, Callahan LF. Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices. II Second line drugs and prednisone. *J. Rheumatol* ;19:1885-1894, 1992.
- 閔炳奭: 류마티양관절염의 감별진단, 대한의학협회지, (20);6, 1977.
- 崔容泰 外, 最新鍼灸學, 서울, 成輔社, 1983.
- 이삼열외, 임상병리검사법, 서울, 연세대학교출판부, 439-440, 1985.
- 陳師文, 太平惠民和劑局方, 北京, 人民衛生出版社, p42-43, 1985.
- 申載鏞, 方藥合編解說, 서울, 成輔社, 1991, p79.
- 李鳳教, 證狀鑑別治療, 서울, 成輔社, 1992, p317.
- 失數道明, 最新韓方處方解說, 대구, 東洋綜合通信教育院出版部, pp407-408, 1986.
- Colpaert FC. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain*;28:201-222, 1987.
- W. P. Arend and Jean-Michel Dayer, Cytokine and Cytokine inhibitors or Antagonists In Rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 33(3):pp305-315, 1990.
- Peter Schenck, Stefan Schneider, Rolf Miehke, and Peter Prehm, synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol*, 22:pp400-405, 1995.
- 해리슨번역 편찬위원회, Harrison 내과학, 서울, 정답, p1777, 1997.
- K. Morgan, R. B. Clague, I. Reynolds and M. Davis, Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis, *Brit. J. Rheum.* 32:pp333-335, 1993.
- 박동준, 김동집, 류마티스관절염의 병인, 대한류마티스학회지, (1):1-12, 1994.
- Prue H. Hart, Gerard F. Vitti Diana R. Burgess, Genevieve A. Whitty, Diana S. Piccoli, and John A. Hamilton, Potential antiinflammatory effects of interleukin 4, Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, pp3803-3807, 1989.
- Joseph McDonnell, Lori A. Hoerner, Michael W. Lark, Coral Harper, Tanvi Dey, Julie Lobner, Gerge Eiermann, Diana Kazazis, Irwin I. Singer, Vernon L. Moore, Recombinant human interleukin-1 β -induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 35(7):799-805, 1992.
- American College of Rheumatology ADHOC Committee, Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis, *Am. College. Rheumato.* 39(5):pp713-722, 1996.
- Michael J, Elliott., Ranvinder N. Maini, New Directions for biological therapy in rheumatoid arthritis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104, pp112-125, 1994.
- 林鐘國, 鍼灸治療學, 서울 集文堂, pp476-477, p944, 1983.
- 이수호, 최용태, 精神鍼灸學, 서울, 杏林書院, 583-584,754-757, 792,886, 1974.
- 김정제, 診察要覽, 서울, 東洋醫學研究院, p459, 1974.
- 朴炳坤, 增補韓方臨床40年, 서울, 大光文化社, p343, 1989.
- 李挺, 原本編註醫學入門(下), 서울, 南山堂, p124,452,453, 1866.
- 朴琴, 類證治載, 중국, 旋風出版社, 1980, pp211-212.
- 陳貴廷外, 實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, p637, 1992.
- 石世一外, 整形外科學, 서울, 最新醫學史, pp121-153, 1986.
- 李文鎭외, 內科學(下卷), 서울, 學林社, pp1663-1698, 1986.
- 張介賓, 景岳全書(上), 서울, 大成文化史, p43, 410, 1985.
- 巢元方, 巢氏諸病源候論, 臺北, 超人出版社, pp11-12, 1974.
- 정서희, 痲病的 문헌적 연구, 서울, 大韓韓醫學會誌, (16):10, 1995.
- 李尙珠外 3人, 類風濕性關節炎의四肢血流改變及中西醫結合治療, 中國中西醫結合雜誌, (14)11:681, 1994.
- 나창수, 안병철, 류마티스성 관절염에 관한 임상적 고찰, 大韓韓醫學會誌, (14)2:364-369, 1993.
- 王琦外 4人, 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, 206-207, 1983.
- 李挺, 醫學入門, 서울, 南山堂, 卷四, p206,281, 卷六 p455, 1996.
- 姜仁守, 痔證治療의 用藥에 관한 小考, 大韓韓醫學會誌, (11)1, p245-252, 1990.
- 黃度淵, 醫宗損益(上), 서울, 麗江出版社, p365, 1993.
- 黃度淵, 證脈方藥合編, 南山堂, pp218-219, 1993.
- 허준, 동의보감, 법인문화사, pp788-789, 1999.
- 田元準, 대방풍탕의 LPS유발 관절염 완화효과에 관한 실험적 연구, 동국대 한의학연구소논문집 Vol 19, p42, 2000.
- 崔斗善, 대방풍탕이 흰쥐의 장기조직에 미치는 영향, 한의학 연구소 동의한의연 제3집, p53, 1999.
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves MN, Elde R and McCleskey EW. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*;387:505-508, 1997.
- Mapp PI, Walsh DA, Garrett NE, Kidd BL, Cruwys SC, Polak JM and Blake DR. Effect of three animal models of inflammation on nerve fibres in the synovium. *Ann. Rheum. Dis.*;53:240-246, 1994.

45. Donaldson LF, Seckl JR and McQueen DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat-effects of adjuvant dose. *J. Neurosci. Methods*;49:5-10, 1993.
46. Colpaert FC. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain*;28:201-222, 1987.
47. Besson J-M, Guilbaud G. The arthritic rat as a model of clinical pain, Amsterdam: Excerpta Medica, 1988.
48. 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* ;273:R1550-R1556, 1997.
49. 裴正學, 血證論校釋, 서울, 一中社, p248, 1986.
50. 歐陽錡, 證治概要, 北京, 人民衛生出版社, p111, 1982.
51. Meller ST, Cumming CP, Tranb RJ, and Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience* a;60:367-374, 1994.
52. Evans CH. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions [Suppl]*;47:107-116, 1995.
53. Cannor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, and Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* ;273: 15-24, 1995.
54. 南京中醫學院, 諸病源候論校釋, 北京, 人民衛生出版社, p40-41, 1983.
55. 楊繼洲, 針灸大成, 서울, 大成文化史, p107,343,352,384,410, 1985.