

高頻度電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른 中樞神經系 神經細胞의 活性變化에 미치는 影響

손성세 · 남상수 · 이재동 · 최도영 · 안병철 · 박동석 · 이윤호 · 최용태*

ABSTRACT

Effect of stimulation-duration of high frequency electroacupuncture on the neuronal activities in the spinal cord and brainstem using Fos immunohistochemical technique.

Sohn, Sung-Sae · Nam, Sang Soo · Lee, Jae Dong · Choi, Do Young
Ahn, Byoung Choul · Park, Dong Seok · Lee, Yun Ho · Choi, Yong Tae

Dept. of Acupuncture & Moxibustion
Oriental Medical College, Kyung Hee University

The present study was designed to investigate the effect of different stimulation-duration of high frequency electroacupuncture(EA) treatment on the neuronal activities in the spinal cord and brainstem using Fos immunohistochemical technique. Three different stimulus-duration was used in this experiment : 30minutes, 1 hour and 2 hours. The summerized results were summerized as follow :

1. The number of Fos expression was significantly increased in the spinal cord dorsal horn depending upon the increase of stimulus-duration ($P<0.05$). Otherwise, there was no significant difference between 30 minutes EA treated group and anesthetic control.

2. High frequency EA biphasic stimulation significantly enhanced the Fos expression in the DR, middle and rostral portion of PAG LD, and caudal PAG LV after 1 hour and 2 hours treatment. The number of Fos immunoreactive neuron in the brainstem was increased according to the length of stimulus-duration.

Those results indicate that at least 1 hour EA treatment was necessary to increase the neuronal activities in the spinal cord and brainstem. Those basic data from this study can be applied to establish the effective treatment of EA for pain control in the clinical field.

Key words: electroacupuncture(EA), frequency, stimulus-duration, spinal cord, brainstem, Fos

*慶熙大學校 韓醫科大學 鍼灸學教室

I. 結 論

최근에 臨床에 사용되는 刺針方法은 전통적인 手技方法과 더불어 여러 가지 刺戟方法이 活用되고 있다. 그 중 電鍼療法은 프랑스의 Sarlandiere가 1825년 神經系統 疾患에 처음 사용한 이후, 근래에 이르러 臨床에 폭넓게 응용되고 있다. 電鍼은 지속적인 運鍼에 대체할 수 있고 刺戟量을 客觀的으로 조절할수 있다는 長點이 있어 神經痛이나 癱瘓疾患 等 機能性 疾患에는 더욱 效果의인 것으로 알려져 있다^{1,6)}.

電鍼療法은 刺戟要件에 따라 治療效果가 차이가 있으며 朴²⁾은 電鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響을 報告하였고, 辛³⁾은 電鍼의 周波數 및 電壓變化가 鎮痛效果에 미치는 影響을 報告하였으나 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따라 내인성 痛痛 조절계를 구성하는 神經핵내에 존재하는 神經세포들의 活性變化에 미치는 影響에 대해서는 연구가 미약한 실정이다.

최근 간접적으로 神經세포의 활성을 측정하는 방법 중 Fos 단백질에 대한 면역조직화학법이 많이 이용되고 있으며 이 방법은 외부 및 내부의 자극에 의해 神經세포의 활성이 증가하면 c-fos 유전자가 증가되고 이에 의해 Fos 단백질의 생산이 증가하게 되는데 Fos 단백질은 자극이 가해진 후 약 30분 경부터 세포질 내에 생산되기 시작하며, 자극이 있는 후 20-90분에는 종래에 상용되고 있는 면역조직화학법에 의해 이 단백질이 神經세포내에 축적되는지의 유무를 쉽게 감지할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서 이러한 c-fos gene 및 단백질의 특성을 이용한 면역조직화학법을 통해 Fos 단백질을 측정함으로써 다양한 형태의 자극에 대한 神經세포들의 단기반응(short term response) 및 활성증가 여부를 간접적으로 측정, 분석하는데 이용할 수 있다^{11,12,14)}.

이에 著者는 電鍼 刺戟 지속시간이 중추신경계 神經세포 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 다양한 시간으로 高頻度 兩極性 矩形波型의 전침 자극을 한 후 Fos단백질에 대한 면역염색법을 실시하여 神經세포의 활성을 분석해본 결과 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物

체중 200-250g인 Sprague Dawley종 雄性 白鼠 (대한실험동물, n=50)를 선별하여 실험 기간중 stress 및 환경의 변화를 최소화함으로써 실험의 적 요인들이 神經세포의 활성에 영향을 미치지 않도록 실험동물을 관리하였다. 또한 실험전과 후에 실험동물의 건강상태를 점검하여 외상의 여부와 질병상태를 평가하였으며, 이를 바탕으로 정상적인 실험동물에서 얻은 결과만을 분석에 이용하였다. 모든 실험은 神經활성의 diurnal variation을 배제시키기 위해 오전 8시에서 12시 사이에 실시하였으며, 마취로 인한 체온하강을 방지하기 위해 실험 전과정에 거쳐 실험동물의 직장체온을 측정, 관찰하였으며, 일정한 수준의 체온을 유지하도록 하였다.

2. 電鍼刺戟

電鍼刺戟은 실험동물의 後肢에 위치하는 tibia anterior tubercle 外側 5mm 및 tibia와 fibula 사이에 위치하고 있는 足三里(ST36)에 兩極性으로 한쌍의 鍼을 刺戟하여 실시하였다¹³⁾. 電鍼刺戟에 사용한 전기자극기는 Grass S88 dual channel stimulator로서 constant current unit를 부착하여 100Hz, 0.5 msec duration, 및 3mA 인 兩極性 波形을 실험동물에 전도할 수 있도록 하였다. 刺戟의 強度는 실험동물에서 첫 번째 근육경련을 관찰할 수 있는 強度의 5배가 되는 強度가 되도록 하였다. 전체 자극에 소요되는 시간은 처리군의 특성에 따라 각각 30분, 1시간 및 2시간으로 하였다. 전침자극이 가해지는 전 실험기간동안 isoflurane을 이용하여, 실험동물을 흡입마취함으로써 실험동물이 전침 자극기간동안 느낄 수 있는 stress를 최소화하였으며, 마취의 정도는 실험동물의 호흡수와 체온으로 진정상태가 유지되도록 하였다.

3. 조직의 처리

電鍼刺戟이 끝난 실험동물을 isoflurane으로 심 마취시킨 후 대동맥을 통해 고정액을 관류시켜 고정하였다. 고정액을 주입하기 전 calcium free tyrode용액 100ml을 주입하여 조직으로부터 혈액

을 완전히 제거한 후 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 포함한 0.4M phosphate buffer(Lana's fixative)를 판류시켜 조직을 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 신속히 분리하여 동일한 고정액에서 4시간동안 후고정하였으며, 10%, 20%, 30% sucrose 용액에 차례로 침전시켜 조직이 동결시 손상되지 않도록 하였다. 실온에서 24시간동안 sucrose 처리가 끝난 조직은 -20°C 의 온도로 freezing stage에서 신속히 얼리고 sliding microtome을 사용하여 두께 40um로 연속절편을 제작하여 면역조직화학법에 사용하였다.

4. Fos 단백질에 대한 면역조직화학적 검정

본 실험에서 사용한 면역조직화학법은 Avidin-Biotin peroxidase method를 사용하였으며 항체의 비특이적 반응을 줄이고 항원항체반응의 민감도를 높이기 위해 biotin amplification 방법¹²⁾을 사용하였다. 면역조직화학법에 사용한 Fos 단백질에 대한 일차 항혈청은 anti-Fos rabbit IgG (Calbiochem) 및 anti-Fos sheep IgG (Cambridge)를 각각 1: 100,000 및 1: 1,000으로 희석하여 4°C 에서 24시간동안 조직에 처리하여 반응시켰다. Anti-Fos rabbit IgG (Calbiochem)을 사용한 경우 일차 항혈청 처리가 끝난 조직은 산양에서 생산한 이차항체 (goat anti rabbit IgG, vector 1:200)를 이용하여 실온에서 1시간 처리하였다. 항체반응이 끝난 조직은 avidin-biotin complex (Elite kit, Vector, 1:250)을 실온에서 30분간 반응시켰으며 반응이 끝난 조직은 Biotinylated tyramine(BT: 1ul BT/ml PBS + 0.005% H_2O_2)과 20분동안 실온에서 반응시킨 후 다시 avidin-biotin complex (Elite kit, Vector, 1:500)와 실온에서 1시간동안 반응시켰다. Avidin-biotin complex와 반응이 끝난 조직은 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, Sigma)를 녹인 Tris-buffer에서 반응시켜 실온에서 발색시켰다. 각 단계마다 반응이 끝난 조직은 TPBS를 사용하여 잔류 항혈청을 완전히 제거한 후 다음 단계로 진행하였다. 형광물질을 이용하여 발색할 조직은 anti-Fos rabbit IgG (Calbiochem)를 각각 1: 100,000으로 희석하여 4°C 에서 24시간 처리하여 반응시킨 후 이차항체 (goat anti rabbit IgG, Jackson, 1:200)를 이용하여 실온에서 1시간

처리하였다. 항체반응이 끝난 조직은 avidin-biotin complex (Elite kit, Vector, 1:250)를 실온에서 30분간 반응시켰으며 반응이 끝난 조직은 Biotinylated tyramine(BT: 1ul BT/ml PBS + 0.005% H_2O_2)과 20분동안 실온에서 반응시킨 후 FITC-conjugated streptavidin(Jackson, 1:200)과 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide glass위에 올리고 완전히 건조시킨 후 alcohol의 농도를 높이면서 탈수시키고 cover glass를 씌워 봉입하였다.

5. 실험설정

실험동물은 isoflurane으로 흡입마취시킨 후 電鍼刺戟의 자극시간에 따른 신경세포의 활성을 관찰하기 위해 高頻度 (100Hz)의 兩極性 矩形波型을 각각 30분, 1시간 및 2시간동안 처치하고 중추신경계의 신경세포 활성을 검정하였다.

6. 대조군

대조군으로서는 실험에 사용한 흡입마취가 실험동물의 신경활성에 미치는 영향을 검정해 보기 위해 실험에 사용한 동일한 강도의 흡입마취를 실시하고, 전침자극을 가하지 않은 상태에서 30분, 1시간 및 2시간동안 처치한 후 고정된 뇌와 척수로부터 분리한 조직을 사용하여 Fos 단백질에 대한 면역조직화학을 실시한 후 Fos 단백질의 핵내 축적 정도를 분석하여 대조군으로 사용하였다

7. 결과분석 및 통계처리

실험에서 분석하고자 하는 신경핵(nucleus)의 명칭과 경계는 Paxinos 및 Watson (1986)이 제작한 Rat Brain Atlas를 참조하였고 면역반응이 완료된 조직은 Zeiss Axiophort 2 현미경을 이용하여 각각 400배 및 1000배의 배율로 관찰하였다. 뿐만 아니라 핵내에 Fos 단백질을 축적하고 있는 신경세포의 숫적인 변화를 관찰하기 위해 digital image analysis system (Meta-Morph, Universal Imaging Co.)을 이용하여 평균 grey level이 130 unit이하 되는 신경세포만을 선택적으로 선별하여 측정하였다. 신경세포의 숫적변화는 연결된 computer에 자동적으로 저장되며, 측정이 끝난 후 일괄적으로 통계처리하였다. 실험에 사용

한 조직은 실험동물별로 가장 선명한 면역성을 가진 조직중 5개를 선별하여 뇌와 척수내의 신경핵별로 숫적인 변화를 관찰하였다.

실험결과는 1-way ANOVA (Statview512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)을 이용하여 통계처리 하였으며 probability values를 측정하기 위해 Scheffe F test를 실시하며, 실험동물간의 variance도 고려하였다.

III. 實驗 成績

1. 高頻度 兩極性 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른 척수내 Fos 단백질 생산 신경세포수

전침자극 없이 isoflurane으로 마취만을 실험기간동안 유지시킨 대조군의 경우 마취지속시간이 증가함에 따른 척수내 신경세포의 활성변화를 관찰할 수 없었다 (Table 1 및 Figure 1, $P < 0.05$). 한편 Table 1 및 Figure 1에서 보는 바와 같이 高頻度 兩極性 矩形波形을 30분간 처치한 경우, 대조군에 비해 신경활성의 증가를 나타내지 않았다 ($P < 0.05$). 반면 1시간 및 2시간동안 처치한 실험군의 척수내 dorsal part에서는 각각 평균 12.6개, 및 40.3개의 Fos 단백질을 함유하고 있는 신경세포를 관찰할 수 있어 각각의 대조군에 비해 급격한 숫적인 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1, $P < 0.05$). 뿐 만 아니라 2시간동안 高頻度 兩極性 電鍼刺戟을 처치한 실험군의 경우 1시간동안 전침자극을 가한 실험군에 비해 척수내 신경세포의 활성이 두배이상 증가하는 양상을 나타내었다 (Table 1, $P < 0.05$). 한편 처치군들의 척수내 ventral part에서는 Fos 단백질에 대한 면역염색성이 극히 낮게 관찰되었다(Fig.1).

Table 1. The number of Fos expression induced by biphasic 100Hz EA treatment with different treatment duration in the lumbar spinal cord

Sites	30 min		1 h	
	Anesthetic control	EA treatment	Anesthesia control	EA treatment
laminae I - III	3.3±0.5	5.7±2.9	4.2±0.9	12.6±1.2*
laminae VII - IX	1.3±0.8	1.3±0.4	1.5±0.5	1.7±1.1

Sites	2 h	
	Anesthesia control	EA treatment
laminae I - III	3.9±1.1	40.3±2.3*+
laminae VII - IX	1.3±0.9	2.3±0.9

Each value denotes the mean with SEM (n=3).

* : significantly different from the value of anesthesia control group ($P < 0.05$)

+ : significantly different from the value of 1h EA treatment group ($P < 0.05$)

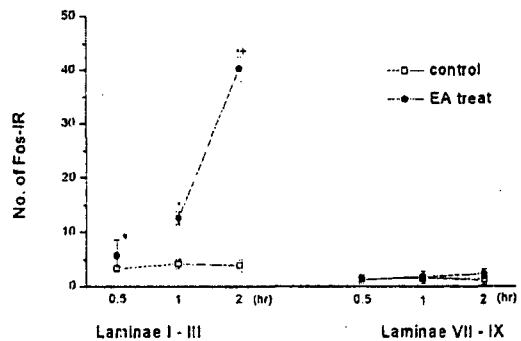


Figure 1. The number of Fos expression induced by biphasic 100Hz EA

treatment in the lumbar spinal cord
according to different duration of
treatment

Each value denotes the mean with SEM
(n=3).

* : significantly different from the value of
anesthesia control group (P<0.05)

+ : significantly different from the value of 1h
EA treatment group (P<0.05)

2. 高頻度 兩極性 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른
brain stem내 Fos 단백질 생산 신경세포수

高頻度 兩極性 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른
brain stem내 신경세포 활성변화를 관찰하기 위
해 각각 30분, 1시간, 및 2시간동안 高頻度 兩極
性 矩形波型을 처치한 후 brain stem내 Fos 단백
질을 함유하고 있는 신경세포의 숫적인 변동을
검색하였다. DR, middle 및 rostral portion에 위
치한 PAG LD, 및 caudal portion의PAG LV에서
는 高頻度 電鍼刺戟을 가한 지 1시간이 경과한
후부터 대조군에 비해 신경세포의 활성증가가 관
찰되었다 (Table 2, P<0.05). 뿐 만 아니라 이들
신경핵내의 신경활성은 電鍼刺戟 時間이 길어짐
에 따라 증가하는 양상으로 관찰되었다 (Fig.
2A 및 B, P<0.05). 한편 LC (Fig. 2A) 및 middle
portion에 위치한 PAG LV(Fig. 2B)에서는 전침
자극을 가한 후 1시간이 경과할 때까지는 대조군
에 비해 Fos 단백질을 함유한 신경세포의 숫적인
변화를 관찰할 수 없었으나, 2시간이 경과하였을
때는 대조군에 비해 활성이 유의성있게 증가함이
관찰되었다 (P<0.05). 반면 30분간 高頻度 兩極性
電鍼刺戟을 처치한 실험군에서는 대조군에 비해
신경세포의 활성증가로 인한 Fos 단백질의 핵내
축적이 통계학적으로 유의성있게 증가함을 관찰
할 수 없었으며, 특히 Gi, 전체에 걸친 dorsal
part PAG, caudal portion의 PAG LD 및 RMg에
서는 電鍼刺戟時間이 증가함에 따라 신경세포의
활성이 증가함을 관찰할 수 없었다 (Table 2,
P<0.05).

Table 2. The number of Fos positive neurons
induced by biphasic 100Hz EA
treatment in the brain stem

according to different duration of
treatment

Nuclei	30 min		1 h
	Anesthesia control	EA treatment	Anesthesia control
DR	12.4±1.3	13.1±2.6	11.9±1.5
Gi	2.1±1.2	2.9±1.8	2.4±0.6
LC	7.1±1.8	7.6±0.8	6.6±1.6
PAG D Caud	12.4±1.2	11.1±1.0	11.9±1.5
PAG D Mid	16.4±1.2	15.4±1.9	15.8±0.9
PAG D Rost	18.4±2.5	20.0±1.5	18.2±1.6
PAG LD Caud	19.3±1.1	19.0±0.9	18.5±1.6
PAG LD Mid	11.2±1.2	12.5±1.8	10.5±1.6
PAG LD Rost	11.9±0.7	12.3±1.4	11.2±1.0
PAG LV Caud	21.5±2.4	24.6±2.0	20.9±3.1
PAG LV Mid	8.4±2.1	10.4±1.8	8.1±1.6
RMg	1.0±0.3	1.6±0.9	1.5±0.2

Nuclei	1 h		2 h	
	EA treatment	Anesthesia control	EA treatment	Anesthesia control
DR	15.4±1.2*	11.7±1.7	19.5±1.5**	
Gi	3.2±1.4	1.7±0.4	3.6±1.8	
LC	9.1±2.8	6.2±2.6	14.3±2.1*	
PAG D Caud	12.4±0.8	11.7±1.9	11.3±0.7	
PAG D Mid	15.0±1.2	15.4±1.5	13.3±2.8	
PAG D Rost	19.6±1.3	17.1±1.8	20.1±2.9	
PAG LD Caud	17.5±1.0	18.1±1.6	16.2±1.9	
PAG LD Mid	14.2±1.2*	9.3±1.8	17.1±1.6*	
PAG LD Rost	15.7±1.6*	10.7±1.3	19.0±0.9**	
PAG LV Caud	37.2±2.9*	20.7±3.1	55.2±4.7**	
PAG LV Mid	10.6±2.8	7.3±1.4	16.5±1.3*	
RMg	1.4±0.4	1.2±0.2	1.4±0.1	

Abbreviation : DR, dorsal raphe nucleus ;Gi,
gigantocellular nucleus ; LC, locus coeruleus ;
PAG D Caud, dorsal portion of caudal
periaqueductal gray ; PAG D Mid, dorsal
portion of middle periaqueductal gray ;PAG D
Rost, dorsal portion of rostral periaqueductal
gray ;PAG LD Caud, laterodorsal portion of
caudal periaqueductal gray ; PAG LD Mid,

laterodorsal portion of middle periaqueductal gray ;PAG LD Rost, laterodorsal portion of rostral periaqueductal gray ;PAG LV Caud, lateroventral portion of caudal periaqueductal gray ; PAG LV Mid, lateroventral portion of middle periaqueductal gray ; RMg, raphe magnus. Each value denotes the mean with SEM (n=3).

* : significantly different from the value of anesthesia control group (P<0.05) + : significantly different from the value of 1h EA treatment group (P<0.05)

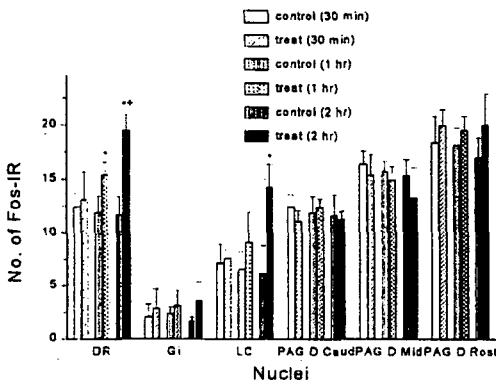


Figure 2-A. The number of Fos positive neurons induced by biphasic 100Hz EA treatment in the brain stem according to different duration of treatment

Each value denotes the mean with SEM (n=3).

* : significantly different from the value of anesthesia control group (P<0.05) + : significantly different from the value of 1h EA treatment group (P<0.05)

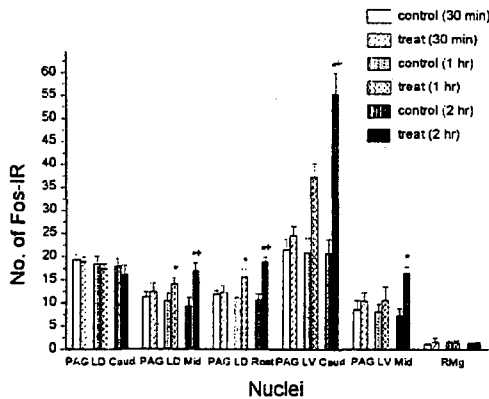


Figure 2-B. The number of Fos positive neurons induced by biphasic 100Hz EA treatment in the brain stem according to different duration of treatment

Each value denotes the mean with SEM (n=3).

* : significantly different from the value of anesthesia control group (P<0.05)

+ : significantly different from the value of 1h EA treatment group (P<0.05)

IV. 考 察

電鍼療法은 穴位에 刺針하여 感應이 있는 후鍼柄에 電流를 통하여 機械的 刺戟과 電氣的 刺戟을 結合시킨 治療法이다.

최초로 이 방법을 발표한 사람은 프랑스의 Louis Berlioz로 프랑스에서 최초로 침술을 사용하였다. 그는 1816년 침치료로 신경통을 치료하였다고 발표하였으며 침에 전류를 통함으로써 전기적인 자극을 혈위에 처치하면 일반적으로 사용하는 침술방법보다 높은 치료효과를 얻을 수 있다고 발표하였다. 이후 프랑스의 의사인 Sarlandiere가 神經系統 疾患에 電鍼을 사용하여 그 치료효과를 발표하였으며(1825년), 그는 이러한 전침술법을 Galvanopuncture라고 명명하였다^{1,6)}.

電鍼은 일반적으로 손으로 행하여 지는 지속적인 運鍼법을 대체할 수 있으며, 人力을 절약할 수 있고 비교적 자극량을 객관적으로 조절할 수 있다는 長點이 있어 疼痛疾患, 癱瘓疾患 等 일반적인 刺針療法의 適應症은 모두 應用되고 있으며, 神經痛이나 癱瘓疾患 等 機能性 疾患에는 특히 效果的인 것으로 알려져 있다⁶⁾.

이러한 電鍼療法은 刺戟의 波形, 주파수, 전압, 통전시간 등에 따라 다른 치료효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 차²⁾은 電鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 영향에서 矩形波, 三角波, 正弦波에 따라 相異하게 나타나며, 周波數, 電壓 및 통전시간도 鎮痛效果에 영향을 미친다고 보고하였다. 張⁴⁾은 연속파, 단속파, 소밀파가 鎮痛效果에 미치는 영향을 검증하였던 바, 연속파가 단속파와 소밀파에 비해 양호한 鎮痛效果를 나타낸다고 보고하였으며, 正方向, 負方向, 및 正負兩方向의 鎮痛效果는

正方向이 負方向 및 正負兩方向보다 鎮痛效果가 증가한다고 하였다. 辛³⁾은 電鍼의 주파수 및 전압변화가 鎮痛效果에 미치는 영향에 대해 보고하였는데, 1 Hz, 4 V에서 持續적으로 優越한 效果가 있음을 보고 하였다.

周波數에 있어서는 Anderson等¹⁶⁾은 疼痛閾值에 있어서 高頻度는 저빈도에 비하여 일시적인 上昇만을 나타내며, 저빈도인 2Hz의 주파수로 자극할 경우 痛阈역치가 완만하게 증가하는 양상을 보이며, 電鍼刺戟이 終止된 이후에도 鎮痛效果가 완만히 下降는 양상을 보인다고 발표하였다. 반면에 高頻度인 100 Hz로 電鍼刺戟을 하였을 경우 단기간내에 鎮痛效果를 나타내었으며, 10Hz 에서는 100 Hz와 2 Hz에서 얻어진 結果의 혼합된 양상을 나타낸다고 보고하였다. Holmgren 等¹⁰⁾에 의하면 周波數가 높으면 鎮痛效果는 감소하고 筋緊張은 억제되며, 周波數가 낮으면 鎮痛效果는 증대하나 이에따른 筋緊張도 증대된다고 하였다. 또한 北出⁷⁾에 의하면 得氣와 유사한 감각을 얻을 수 있는 주파수는 대개 1-5Hz이며 癡醉에서는 1Hz가 가장 효과적이라고 발표하였다.

電鍼刺戟時間에 따른 鎮痛效果의 발현은 Wang²⁰⁾은 30분이 적합하다고 하였고Toshikatsu¹⁹⁾는 10-30분간의 자극지속시간이 적합하다고 하였으며, Cai⁹⁾는 20-30분이 가장 좋고 10분 이하의 電鍼刺戟은 효능이 없다고 하였으며 Zhuang等²¹⁾은 20분보다 짧아서는 안된다고 하였으며 北出⁷⁾은 10-15분이면 충분하며 Zhen²⁰⁾은 15분 이하로 하여서는 안된다고 하였다.

電鍼刺戟의 자극지속시간이 鎮痛效果에 미치는 影響에 관한 여러 연구보고가 있음에도 불구하고, 뇌와 척수에 존재하는 내인성 동통 조절계의 신경세포들의 활성화에 電鍼刺戟의 지속시간이 어떠한 영향을 미치며 진통작용을 나타내는지에 대해서는 연구가 아직 미약한 실정이다.

이에 본 實驗에서는 刺戟時間에 따른 신경세포의 활성변화를 관찰하기 위하여 신경세포의 활성을 간접적으로 측정할 수 있는 방법중의 하나인 Fos 단백질에 대한 면역조직화학법으로 어떠한 高頻度 電鍼刺戟時間이 효과적으로 척수내의 이차신경세포군의 활성을 증가시키는지의 여부를 검증하였다.

신경세포의 활성도를 간접적으로 검증하는데

사용되는 Fos 단백질은 포유류에 존재하는 proto-oncogene의 일종인 c-fos 유전자의 활성증가로 생산되는 것으로 알려져 있다. 이러한 c-fos 유전자는 2 murineosteogenic sarcoma virus에서 발견되는 v-fos와 동일한 것으로서 자극에 의해 빠르게 발현하기 때문에 primary response gene 또는 early response gene이라고도 한다. 특히 신경세포내에서 nerve growth factor, cholinergic neurotransmitter, 및 calcium과 cAMP와 같은 second messenger들의 활성화에 의해 발현되며, 최근에 발표된 연구에서는 c-fos 유전자가 세포막에 존재하는 NMDA 수용체나 L-type calcium channel 등의 활성증가에 의해서도 발현될 뿐만 아니라 특히 신경세포가 외부 및 내부의 자극에 의해 탈분극되는 초기에 발현된다고 보고되어 있다¹⁷⁾.

따라서 초기 자극에 의해 신경세포가 탈분극됨으로써 c-fos 가 발현되며 그 결과 생산되는 Fos 단백질과 또다른 primary response gene의 일종인 c-jun proto-oncogene의 발현으로 생산되는 Jun 단백질이 동시에 신경세포 DNA내의 AP-1 regulatory site에 결합함으로써 다른 target gene들의 활성화와 발현을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

c-fos 유전자의 활성증가에 의해 생산되는 Fos 단백질은 54kD nuclear phosphoprotein이며, cytoplasm에서 합성되어 빠른 시간내에 핵내로 이동하여 저장된다. 이러한 Fos 단백질은 최초 자극이 있는 지 약 30분 후부터 세포질 내에 나타나기 시작하며, 최초자극이 있을 후 20-90분에는 종래에 상용되고 있는 면역조직화학법에 의해 Fos 단백질의 신경세포내 축적유무를 쉽게 감지할 수 있다. 따라서 신경세포의 활성증가로 생산된 Fos 단백질의 핵내 축적정도는 신경세포의 활성변화를 간접적으로 검증할 수 있는 유용한 marker로 사용되고 있다^{11,12,13,17)}.

여러 가지 신경세포들의 활성을 동시에 분석할 수 있는 이상적인 marker가 되기 위해서는 말초 부위에 전달된 자극에 의해 활성이 증가하는 sensory pathway내의 전체 신경세포들의 활성변화를 동시에 나타낼 수 있어야 한다. 이러한 관점에서 Fos 단백질은 외부 및 내부에서 전달되어 온 자극에 반응하는 전체 신경세포들의 활성을

동시에 분석할 수 있는 완벽한 marker로 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다.

그러나 이러한 Fos 단백질을 신경세포의 활성 변화에 대한 marker로 사용하기 위해서는 다음과 같은 몇가지 사항을 염두에 두어야 한다⁸⁾.

첫째는 Fos 단백질을 이용하여 검정한 신경세포의 활성변화에 대한 결과는 2-deoxyglucose 법에 의해 밝혀진 실험의 결과와 언제나 일치하지는 않는다는 것이며 이러한 현상은 2-deoxyglucose 법에 의해 신경세포의 활성을 분석할 경우 신경세포의 axon 및 dendrite와 같은 미세구조에서 일어나는 활성의 변화도 인지할 수 있지만 Fos 단백질을 이용한 면역조직화학법에 의해서는 신경세포의 핵내 Fos 단백질을 감지하여 신경 세포체 내에서 일어나는 활성변화만을 감지 하기 때문인 것으로 추측된다¹⁸⁾.

둘째는 중추신경계의 특정부위에서는 가해지는 자극의 강도와는 관계없이 신경활성이 증가하더라도 Fos 단백질을 생산하지 않기 때문에 자극에 의한 신경세포의 활성변화를 감지 할 수 없는 경우이다. 이러한 현상은 중추신경계중 substantia nigra에서 관찰되는 것으로 알려져 있으며, 신경세포의 활성이 증가함으로써 발생하는 여러 가지 second messenger system 중 c-fos oncogene의 활성증가에 관여하는 특정 messenger들이 존재하지 않기 때문에 일어나는 것으로 보고되고 있다.

셋째는 일반적으로 자극이 가해지지 않은 상태의 중추신경계내에서는 Fos 단백질의 생산이 극히 낮은 것으로 알려져 있으나 특정부위의 신경세포에서는 자극이 없는 상태에서도 많은 양의 Fos 단백질을 함유하고 있기 때문에 실험적으로 가하게 될 자극에 관계없이 대조군에서도 Fos 단백질을 인지 할 수 있는 경우이다. 이러한 경우 실험적으로 가해진 외부 및 내부 자극에 의해 신경세포의 활성이 증가하더라도 정상적인 상태에서 이미 많은 양의 Fos 단백질이 신경세포내에 존재하기 때문에 자극에 의해 증가된 Fos 단백질을 감지 할 수 없게 된다.

넷째는 c-fos gene의 활성은 일반적으로 미세한 자극으로도 쉽게 증가되지만 특정부위의 신경세포는 자극의 강도가 강할 때만 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 다시 말해 강도의 강약과 이에 따른 Fos 단백질의 생산은 상관관계를 가지

는 것이 보통이지만 특정 신경세포에서는 Fos 단백질 생산을 유발시키는 역치수준이 높아 강한 자극이 전달된 경우에만 Fos 단백질을 생산한다. 따라서 실험적으로 전달된 자극에 의해 생산이 증가된 Fos 단백질의 유무를 관찰하는 것만으로 특정자극에 반응하는 모든 신경세포의 활성을 감지했다고는 해석하기 힘들다. 이러한 이유로 실험자는 예비실험단계에서 평가하고자 하는 자극의 강도 및 지속시간등에 관한 적정수준을 결정하여 최대한 많은 수의 신경세포들이 반응을 나타내어 Fos 단백질을 생산할 수 있도록 유도하여야 한다.

뿐만 아니라 Fos 단백질의 발현은 ketamine이나 barbiturate와 같은 마취제에 의해 민감하게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 하지만 실험동물을 경마취시킬 경우 정상적인 상태에서 발현되는 Fos 단백질의 양을 현저하게 감소시켜 특정자극에 의해 증가하는 Fos 단백질을 쉽게 감지 할 수 있다는 장점도 가지고 있으므로 실험자는 마취의 강도와 자극의 강도간의 상관관계를 반드시 고려하여야 한다.

마지막으로 외부 및 내부자극에 의한 Fos 단백질의 합성이 시작되는 시기와 생산된 후 Fos 단백질이 분해되어 소멸되는 시간이 신경세포별로 다소의 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. 중추신경계 중 dentate gyrus에 존재하는 granule cell에서는 자극이 있는 후 30분만 경과하여도 최대의 Fos 단백질을 생산하는 것으로 알려져 있지만 다른 부위의 신경세포에서는 같은 자극에 대해 30분이 경과한 시점에서는 합성된 Fos 단백질의 양이 극히 낮아서 감지하기 어려운 것으로 보고되어 있다. 따라서 실험자는 자극에 대한 신경세포의 활성을 Fos 단백질을 이용하여 검정하기 위해서는 신경세포가 최대의 Fos 단백질을 생산하는 시기를 알아야 한다. 뿐만 아니라 보통의 신경세포의 경우 자극에 의해 생산한 Fos 단백질을 약 24시간이 경과하면 분해하여 다시 정상적인 수준까지 감소시키지만 일부의 신경세포의 경우 분해속도가 빨라서 24시간 이전에 생산했던 Fos 단백질을 분해하여 정상수준에 도달하는 것으로 알려져 있다. 따라서 가해진 자극에 대한 신경세포의 반응을 관찰하기 위해서는 반응이 가해진 다음부터 일정한 시간이 경과하여 생산이 증가했던 Fos 단백질이 분해되기전에 관찰하여야 한다.

따라서 신경세포의 활성변화에 대한 metabolic marker로서 Fos면역조직화화법을 사용할 때 다음과 같은 점을 실험자는 반드시 고려해야 한다¹⁴⁾.

1) 실험동물에 가해지는 불필요한 stress나 자극은 실험동물로 하여금 비정상적인 Fos 단백질을 생산하게 하여 실제로 의도한 실험적 자극에 의해 증가한 Fos 단백질을 감지할 수 없도록 한다. 따라서 실험자는 실험개시 24시간이전부터 실험동물의 질병상태 및 사육상태를 점검하여 실험동물이 질병상태에 있는지의 여부를 관찰하여야 하며, 실험과정중에서는 불필요한 stress와 의도했던 자극이외의 불필요한 자극이 실험동물에 가해지지 않도록 하는 것이 중요하다.

2) Fos 단백질의 생산이 여러 가지 마취제에 의해 영향을 받기 때문에 실험자는 실험방법상 마취제를 사용하여야 할 경우 마취제의 선택 및 마취강도에 대해 세심한 신경을 기울여야 한다. 뿐만 아니라 마취제를 사용할 경우 마취제를 사용하지 않은 경우의 Fos 단백질 생산량에 비해 현저한 감소를 나타내기 때문에 일반적으로는 자극의 강도와 지속시간을 증가시켜야 한다. 만약 마취제를 사용하지 않고 실험을 진행할 수 있다면 마취제의 사용은 최소한으로 자제를 해야 하지만 실험방법상 실험동물이 지나치게 stress를 받는다던가 불필요한 자극을 배제하기 어려울 경우 최소한의 마취제를 사용하는 것이 좋다. 뿐만 아니라 마취제중 ketamine이나 barbiturate와 같은 약물은 Fos 단백질의 합성을 현저히 감소시키는 것으로 밝혀져 있으므로 사용하지 않는 것이 좋다.

일반적으로 chloral hydrate나 halothane 및 isoflurane과 같은 흡입마취제가 Fos 단백질의 생산에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 흡입마취제를 이용하여 마취를 할 경우 마취의 지속시간 및 마취의 강도를 실험자가 임의로 조절할 수 있으므로 가장 좋은 방법으로 알려져 있다.

3) 실험설계상 수술이 불가피 할 경우 수술후 최소한 2주일이 경과한 다음 실험동물이 수술로 인한 stress와 수술로 인한 손상에서 완전히 회복된 다음 실험동물을 실험에 사용하여야 한다. 일반적으로 실험동물이 수술후 발생하는 손상과 같은 지속적인 자극에 장기간 노출되면 정상적인

상태에서는 Fos 단백질을 생산하지 않는 것으로 알려진 glial cell이나 ependyma에서도 Fos 단백질을 생산하기 시작한다는 보고가 있다. 따라서 지속적이고 장기적인 자극은 가능한한 배제하여야 한다.

4) 실험자는 실험동물에 자극을 가한 후 언제 실험동물을 희생시켜 Fos 단백질의 축적여부를 관찰할 것인가를 결정하여야 한다. 신경세포의 종류에 따라 자극에 의해 생산되는 Fos 단백질의 양이 시간에 따라 차이를 보이기 때문에 실험자는 예비 실험단계에서 자극을 가한 후 2-4시간 간격으로 실험동물을 희생하여 어느 시기가 가장 최대의 Fos 단백질을 관찰할 수 있는지를 결정하여야 한다.

5) 실험결과의 해석에 있어 자극을 가한 후 Fos 단백질을 함유하고 있는 신경세포는 활성이 증가했다고 해석할 수 있지만 Fos 단백질을 함유하고 있지 않은 신경세포의 경우도 특정한 자극에 의해 활성에 영향을 받지 않았다고는 단정할 수 없다는 것을 명심하여야 한다. 뿐만 아니라 정확한 대조군이 있어야 Fos 단백질의 유무로 신경세포의 활성을 분석할 수 있다는 사실도 고려해야 한다.

결론적으로 외부 및 내부에서 가해진 자극에 대한 신경세포의 활성변화를 측정하는 방법으로 Fos 단백질을 이용한 면역조직화화법이 민감도 및 특이성에서 다른 방법에 비해 우수하다는 것이 일반적인 견해이다¹⁴⁾.

본 실험에서는 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른 신경세포의 활성을 관찰하기 위해 高頻度 (100Hz) 兩極性 矩形波型을 각각 30분, 1시간 및 2시간동안 처치하고 brain stem과 척수 신경세포의 활성을 검정하였다.

電鍼刺戟에 사용한 足三里穴(ST36)은 鍼灸臨牀에서 疼痛疾患의 治療에 많이 활용되는 經穴중 하나로 足陽明胃經의 合土穴로 調理脾胃, 通調經絡, 扶正去邪, 調和氣血 등의 作用을 가지고 胃腸疾患, 腹痛, 膝關節痛, 下肢痛, 泄瀉, 胃痙攣 등에 폭넓게 활용되고 있다⁵⁾.

실험기간동안 불필요한 신경활성의 증가를 배제하기 위해 isoflurane으로 흡입마취시켰으며, 불필요한 刺戟이 실험동물에 가해지지 않도록 주의하였다.

高頻度 兩極性 矩形波型을 이용하여 이 波形的 電鍼刺戟 지속시간에 따른 척수내 신경세포의 활성을 관찰하고자 30분, 1시간, 및 2시간동안 高頻度 兩極性 矩形波型을 각각 처치한 후 척수내 신경세포의 Fos 단백질 축적정도를 검색하였다.

電鍼刺戟 없이 isoflurane으로 마취만을 실험기간동안 유지시킨 대조군의 경우 마취지속시간의 변화에 따른 척수내 신경세포의 활성변화를 관찰할 수 없었다 ($P<0.05$). 한편 高頻度 兩極性 矩形波型을 30분간 처치한 경우, 대조군과 차이를 나타내지 않았다. 반면 1시간 및 2시간동안 처치한 실험군의 척수내 dorsal part내에서는 각각 평균 12.6개, 및 40.3개의 Fos 단백질을 함유하고 있는 신경세포를 관찰할 수 있어 각각의 대조군에 비해 급격한 숫적인 증가를 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라 2시간동안 電鍼刺戟한 실험군의 경우 1시간동안 電鍼刺戟을 가한 실험군에 비해서도 척수내 신경세포의 급격한 활성증가를 나타내었다 ($P<0.05$). 한편 처치군들의 척수내 ventral part내에서는 Fos 단백질에 대한 면역 염색성이 극히 낮게 관찰되었다.

高頻度 兩極性 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른 brain stem내 신경세포 활성변화를 관찰하기 위해 30분, 1시간, 및 2시간동안 高頻度 兩極性 矩形波型을 각각 처치한 후 brain stem내 신경세포의 Fos 단백질을 함유하고 있는 신경세포의 숫적인 변동을 검색한 결과 DR, middle 및 rostral portion에 위치한 PAG LD, 및 caudal PAG LD에서는 高頻度 電鍼刺戟을 가한 지 1시간이 경과한 후부터 대조군에 비해 신경세포의 활성증가가 관찰되었다 ($P<0.05$). 뿐만 아니라 이들 신경핵내의 신경활성은 電鍼刺戟 時間이 길어짐에 따라 증가하는 것으로 관찰되었다 ($P<0.05$).

한편 LC, middle portion에 위치한 PAG LV에서는 電鍼刺戟을 가한 후 1시간이 경과할 때까지는 대조군에 비해 Fos 단백질을 함유한 신경세포의 숫적인 변화를 관찰할 수 없었으나 2시간이 경과하였을때는 대조군에 비해 활성이 증가함이 관찰되었다 ($P<0.05$). 반면 30분간 高頻度 兩極性 電鍼刺戟을 처치한 실험군에서는 대조군에 비해 신경세포의 활성증가로 인한 Fos 단백질의 핵내 축적이 증가함을 관찰할 수 없었으며, 특히 Gi, 전체에 걸친 dorsal part PAG, caudal portion의

PAG LD 및 RMg에서는 電鍼刺戟時間의 증가가 신경세포의 활성에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

본 실험에서 高頻度 兩極性 電鍼刺戟의 刺戟時間에 따른 척수와 brain stem내 신경세포 활성변화는 모두 高頻度 電鍼刺戟을 가한 지 1시간이 경과한 후부터 대조군에 비해 신경세포의 활성증가가 관찰되었다. 따라서 電鍼刺戟에 의해 신경세포의 활성을 증가시키기 위해서는 1시간 이상의 刺戟이 필요할 것으로 관찰되었다. 그러나 기존의 보고들에서는 통전시간에 있어서 20-30분 정도가 적당하다는 것이 일반적인 견해로^{9,19,20,21)} 본 실험에서 관찰할수 있었던 효과유발시간과의 차이는 마취에 의한 것으로 추측된다. 일반적인 경우 전침의 효능을 평가함에 있어 실험동물이 나타내는 tail flick과 같은 행태의 변화로 평가하는데 이 경우 마취를 하지 않은 상태에 실시하는 것이 보통이다. 그러나 본실험에서 電鍼刺戟에 의한 신경세포의 활성을 측정하기 위해 사용한 Fos 단백질에 대한 면역조직화학법은 앞서 설명한 바와 같이 실험 외적 刺戟에 의해 신경세포의 활성이 쉽게 영향을 받기 때문에 이러한 실험오차를 줄이기 위해 c-fos유전자의 발현에 가장 영향이 적은 isoflurane을 사용하여 실험동물을 진정시킨 상태에서 실험을 진행하였다. 따라서 마취를 하지 않은 상태의 실험동물에 비해 진정효과를 나타내는 신경세포의 활성증가추세가 완만해질 가능성을 배제할 수 없다. 뿐만 아니라 電鍼刺戟이 가지는鎮痛效果를 실험동물의 행태변화로 측정하는 것과 실제 신경세포의 활성변화로 측정하는 것에는 차이를 보일 수 있으리라 추측된다.

본 실험을 통해 밝힌 高頻度 電鍼刺戟時間에 따른 신경세포의 활성 변화에 관한 실험결과는 앞으로 임상적 치료효과를 극대화시키는데 일조할 것으로 사료된다.

V. 結 論

電鍼 刺戟 지속시간이 중추신경계 신경세포 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 高頻度 兩極性 矩形波型的 電鍼刺戟을 30분, 1시간 및 2시간 동안 白鼠의 兩側 足三里에 刺戟을 한 후 Fos

단백질에 대한 면역조직화학을 실시하여 신경세포의 활성변화를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 電鍼刺戟 지속시간에 따른 척수내 Fos 단백질 생산 신경세포의 수는 척수내 dorsal part내에서 대조군에 비하여 2시간 처치군, 1시간 처치군의 순으로 유의성 있는 증가를 나타내었으나 30분 처치군에서는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

2. 電鍼刺戟의 지속시간에 따른 brain stem내 Fos 단백질 생산 신경세포의 수는 DR, middle 및 rostral portion에 위치한 PAG LD, 및 caudal PAG LV에서 대조군에 비하여 2시간 처치군, 1시간 처치군의 순으로 유의성 있는 증가를 나타내었으나 30분 처치군에서는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

參 考 文 獻

1. 김재규 의 : 전침치료의 이론과 임상, 서울, 서원당, pp 14-17, 1993.
- 2 朴英培 : 電鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響, 경희대학교박사학위논문, 1984.
- 3 辛源雄 : 電鍼의 周波數 및 電壓變化가 鎮痛效果에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文, 1985.
4. 張慶勳 : 電鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 碩士學位 論文, 1985.
5. 全國韓醫科大學校, 鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學上. 서울, 集文堂, pp.382- 383, 1988.
6. 全國韓醫科大學校, 鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學下. 서울, 集文堂, pp.1447- 1451, 1988.
7. 北出利勝 : 低周波置鍼療法, 東京, 醫齒藥出版社, pp 122-126, 1974.
8. Bullitt E : Expression of c-fos-like protein as a maker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J. Comp. Neurol. 296: 517-530, 1990.
9. Cai Dawei, Lu Wei Jun, et al : The influence of different parameters and

- methods of stimualtion on the effect of electric needling of the same never, BEJING, National symposia, pp.242- 243, 1979.
10. Eddy Holmgren; Increase of pain threshold as a function of conditioning electrical stimulation, Am j. Chin. Med.,3:133-1 42, 1975.
11. Lee J-H, Wilcox GL, and Beitz AJ : Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation, NeuroReport 3, 841-844, 1992.
12. Lee J.H. and Beitz, A.J. : Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation. Brain Res. 577 ; 80-91. 1992.
13. Lee J.H. and Beitz, A.J. : The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. Pain. 52 ; 11-28. 1993.
14. M. Dragunow and R. Faull : The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. J. Neuroscience Methods. 29 ; 261-265. 1989.
15. Naranjo JR, Bellstrom B, Achaval M, Sassone-Corsi P : Molecular pathways of pain: FosserotoninJun-mediated activation of a non canonical AP-1 site in the prodynorphin gene. Neuron. 6: 607-617, 1991.
16. S.A. Anderson, E. Holmgeren ; On acupuncture analgesia and the Mechanism of pain, Am. j. chin. Med.,, 3:311-334, 1975.
17. Sheng M, Greenberg ME : The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron. 4: 477-485, 1990.
18. Schoppman, A., and M.P.Stryker : Physiological evidence that the 2-deoxyglucose method reveals orientation in the cat visual cortex. Nature 293 ; 574-578. 1981.

19. Toshikatsu Kitade, Masayoshi Hydo, et al :
Low-frequency accupuncture treatment, 21:
163-167, 1977.
20. Zhen Qizhi, Wang Mingan, et al : The
influence on acupuncture anesthesia effects
due to the voltage in stimulating
parameters, BEIJING , National Syposia of
Acupuncture and Moxibustion and
Acupuncture Anesthesia, p.p 241-241, 1979.
21. Zhuang Vinliang, Lu Weijun, et al : Analgesic
effect of electro-needling at the Du-MAI
points, a preliminary report on animal
experiment, BEIJING, Nation Symposia of
Acumpuncture and Moxibustion and
Acupuncture Anesthesia, p.p 393-394, 1979.