

원저

耳鍼刺戟이 絶食 Stress로 인한 흰쥐 大腦皮質의 NADPH-diaphorase 神經細胞에 미치는 影響

이정현* · 김이화** · 이은용*

* 세명대학교 한의과대학 침구학교실

** 세명대학교 한의과대학 경혈학교실

Abstract

Effects of Auricular Acupuncture on NADPH-diaphorase Neurons in Brain Cortex of Fasted Rats

Lee, Jung-hyun* · Kim, Ee-Hwa** · Lee, Eun-yong*

* Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Se-Myung University

** Department of Meridianology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Objective : The aim of the present study is to investigate whether stimulating a specific auricular point(胃點) is effect on suppression of appetite.

Methods : This study evaluated the changes of Reduced-Nicotinamide-Adenine-inucleotide-Phosphate-diaphorase(NADPH-d)-positive neurons using a histochemical method. Staining intensities of NADPH-d-positive neurons were assessed in a quantitative fashion using a microdensitometrical method based on optical density by means of an image analyzer.

Results : The results show as follows ;

1. In the RSG/RSA, FR1/FR2, HL, PAR1 area, The optical density of NADPH-d-positive neurons of fasted group was significantly decreased in comparison to fed group.

2. In most cortical area, It was not significant statistically, But the optical density of NADPH-d-positive neurons of fed with auricular acupuncture group was decreased in comparison to fed group.

3. In most cortical area, It was not significant statistically, But fasted with auricular acupuncture group increased the optical density of NADPH-d-positive neurons comparison to fasted group.

· 접수 : 3월 5일 · 수정 : 3월 14일 · 채택 : 3월 20일

· 교신저자 : 이은용, 충북 체천시 신월동 산 21-1, 세명대학교 부속 한방병원 침구과(TEL. 043-649-1816)

E-mail : E-mail : acupley@venus.semyung.ac.kr

Conclusions : We conclude that stimulating the specific auricular points is able to effect on NO(Nitric Oxide)-expression in the brain cortex of sprague dawley rats. The results suggest that auricular acupuncture may be useful for controlling obesity.

Key words : Auricular acupuncture, NO, NADPH-d, Food intake, Obesity

I. 서론

최근 급격한 사회발전에 의해 극심한 stress와 식생활의 서구화로 음식섭취 조절의 부전으로 발생하는 비만을 비롯한 각종 질병은 관심의 대상이 되고 있다.

식사조절을 위한 음식섭취는 서양의학에서 말초적 조절과정과 중추적인 조절과정사이의 연속적인 상호작용에 의해 나타나는 복잡한 현상으로 알려져 있다¹⁾. 이 중, 중추적인 조절과정은 뇌내의 음식섭취를 조절하는 수많은 신경전달 물질에 의해서 영향을 받는데, 최근에는 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO)의 뇌내 활성화 변화에 대한 연구가 음식섭취 행동과 관련되어 진행되고 있다²⁻⁹⁾. 인체 세포내에서 생성되는 NO는 신경계와 혈관계, 근골격계에서 각각 화학적 신호전달 물질, 혈압조절과 혈소판응집, 골격근대사 및 근수축조절 등의 생리학적이며 대사적인 변화를 유도하는 물질로¹⁰⁾ 최근 韓醫學系에서도 NO와 관련된 실험연구가 시도되고 있다¹¹⁻¹²⁾.

한편, 韓醫學에 있어 음식섭취 조절과 관련된 치료 중 耳鍼療法은 최근 식욕에 대한 조절작용 및 비만에 대한 치료점으로 관심의 대상이 되고 있으며, 鍼灸刺戟의 중추신경계 신경전달물질조절에 미치는 영향과 연관되어 그 구체적인 효과가 연구되

고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

耳鍼療法은 耳廓에 刺鍼함으로써 인체 각부의 질병을 치료하는 分區鍼法으로 고대 동양의학을 근거로 광범하게 활용되는 전문의술로 발전한 것이다¹⁵⁾. 耳鍼療法은 질병이 있을 때 耳로 반사되어 분포하고 있는 耳穴을 관찰, 탐측하는 지속적인 임상실천과 이것을 동양의학의 臟象論, 經絡學說과 서양의학의 해부생리학을 결합함으로써 이를 체계화시켜 이론적 근간을 마련한 것이다¹⁵⁻¹⁷⁾. 耳鍼 穴位中 본 실험에서 선택한 胃點은 인체 복강내 장기와 상응하는 耳甲介腔部位에 분포하고 주치효능 또한 소화기 계통 질환 치료의 配穴에 상응하고 정신분열증, 신경쇠약, 히스테리 등의 정신질환에도 응용되고 있다¹⁶⁻¹⁷⁾.

이에 본 연구에서는 韓醫學 鍼灸療法의 한 영역인 耳鍼療法이 음식섭취의 기전에 있어 中樞的 조절과 관련된 물질인 NO의 발현변화에 미치는 영향을 관찰하고자 인위적으로 절식시킨 Sprague Dawley(SD)계 흰쥐에게 인체에 상응하는 胃點에 耳鍼刺戟을 가한 후 NO의 합성효소인 nitric oxide synthase(NOS)의 변화를 reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase (NADPH-d) 조직화학 방법으로 관찰한 결과 若干의 知見을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 실험동물 및 재료

1) 실험동물

실험에 사용한 동물은 체중 300g 내외의 SD계 수컷 흰쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험 당일까지 물과 일반 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)를 충분히 공급하면서, 실온 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하여 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 재료

鍼은 길이 0.8mm, 직경 0.15mm의 stainless steel (정화침구사, 한국) 1회용 鍼을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군 설정

- 정상군(Normal) : SD계 흰쥐 6마리를 1군으로 정상적으로 물과 사료를 공급한 군.
- 대조군(Control) : SD계 흰쥐 6마리를 1군으로 48시간동안 물과 사료를 공급하지 않은 군.
- 실험군 A(Sample A) : 정상군에 耳鍼治療를 시행한 군.
- 실험군 B(Sample B) : 대조군에 耳鍼治療를 시행한 군.

2) 耳鍼刺戟

耳鍼 刺戟은 쥐의 耳部에 있는 胃點에 1cm × 1cm skin tape를 먼저 부착한 다음 耳鍼을 삽입하고, 그 위에 다시 1cm × 1cm skin tape로 고정하여 1일 2회씩 (2:00p.m. and 6:00p.m.), 총 4회 留鍼 施行하였다.

3) 조직처리

耳鍼 刺戟을 한 실험동물과 대조군에게 pentobarbital sodium(60mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 0.05M 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% parafor-maldehyde 용액

(4°C)을 10분간 관류고정시켰다. 이때 관류속도는 50~60ml/min이 되도록 하였다. 관류고정 후 뇌를 적출하여 4~6mm 두께로 관상 절개하여 동일한 고정액에 담가서 4°C에서 16~18시간 동안 후고정한 다음, 0.1 M PBS에 녹인 20% sucrose 용액에서 2~5일간 보관하였다.

Cryocut(Leica, Germany)을 이용하여 40 μm 두께의 연속형단절편을 제작하였고, 자른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하여 염색을 시행하였다.

4) NADPH-d 조직화학

NADPH-d 조직화학을 위하여 조직절편을 0.1% β -NADPH, 0.01% nitroblue tetrazolium, 0.3% Triton X-100을 0.1M PB에 녹인 반응혼합액에 넣어 37°C 수조에서 60~90분간 반응시켜 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직을 PBS로 씻어서 더 이상의 발색을 정지시켰다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 histomount로 봉입하였다.

5) 조직관찰 및 영상분석

대뇌피질에 분포하는 NADPH-d 신경세포의 염색강도는 영상분석기(Multiscan, USA)의 densitometry를 이용하여 측정하였다. Average optical density(AOD)는 흰색을 0, 검은색을 255로 정하여 염색된 조직은 그 사이의 값을 갖고, 이때는 광원의 밝기에 따라 AOD의 값이 달라지므로 광원을 고정시킨 후 측정하였다. 측정된 광원의 밝기는 광원의 밝기에 따라 염색된 전체조직과 조직이 없는 부위를 각각 영상분석기로 측정하여 광원과 AOD 사이의 상관관계 stadard curve를 얻은 후 가장 차이가 많이 나는 영역을 측정 광원으로 정하였다. 이때 각 실험군 당 적어도 10개 영역 이상을 CCD camera를 통해 200 \times 의 광학현미경에서 온 영상을 받아 영상분석기로 측정하였다. 각 부위 세부구조의

위치와 명칭은 Paxinos와 Watson의 부도¹⁸⁾를 참고하였는데 본 실험은 대뇌피질의 영역 중 restoplenial granular/agranular cerebral cortex(RSG/RSA), frontal cortex area 1/2(FR1/FR2), hindlimb area of cortex(HL), parietal cortex area 1(PAR1) 및 parietal cortex area 2(PAR2)의 다섯 영역을 관찰하였다.

6) 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 7.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차(Mean±standard error)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Duncan test 검정¹⁹⁾을 실시하였다.

III. 실험성적

1. Restoplenial granular/Restoplenial a-granular(RSG/RSA) cortex area에서의 NADPH-d 염색성 변화

대뇌피질의 RSG/RSA의 NADPH-d 염색성의 변화를 분석하여 본 결과, 정상군의 OD값은 157.67±1.77, 대조군은 141.13±3.22, 실험군 A는

Table 1. Staining Intensity of NADPH-d-positive Neurons in the RSG/RSA of Rats.

Group	Number of slices	Average optical density	Duncan Grouping
Normal	14	157.67 ± 1.77 ¹⁾	A ²⁾
Control	15	141.13 ± 3.22	B
Sample A	17	150.34 ± 3.29	A
Sample B	15	158.83 ± 3.29	A

1) Data are mean ± SEM of optical density; 2) Means with the same letter are not significantly different at α =0.05; Normal, Fed Group; Control, Fasted Group; Sample A, Fed and Acupuncture Group; Sample B, Fasted and Acupuncture Group.

150.34±3.29, 실험군 B는 158.83±3.29이었다. 정상군에 비해 대조군은 유의한 감소를 나타냈고 실험군 A도 감소를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다. 실험군 A와 B는 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈다(Table 1).

2. Frontal 1/2(FR1/FR2) cortex area에서의 NADPH-d 염색성 변화

대뇌피질의 FR1/FR2의 NADPH-d 염색성의 변화를 분석하여 본 결과, 정상군의 OD값은 158.47 ± 2.17, 대조군은 141.44 ± 4.28, 실험군 A는 151.24 ± 4.19, 실험군 B는 147.67 ± 4.04이었다. 정상군에 비해 대조군은 유의한 감소를 나타냈고 실험군 A도 감소를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다. 실험군 A와 B는 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Staining Intensity of NADPH-d-positive Neurons in the FR1/FR2 of Rats.

Group	Number of slices	Average optical density	Duncan Grouping
Normal	16	158.47 ± 2.17 ¹⁾	A ²⁾
Control	14	141.44 ± 4.28	B
Sample A	14	151.24 ± 4.19	AB
Sample B	15	147.67 ± 4.04	AB

1) Data are mean ± SEM of optical density; 2) Means with the same letter are not significantly different at α =0.05; Normal, Fed Group; Control, Fasted Group; Sample A, Fed and Acupuncture Group; Sample B, Fasted and Acupuncture Group.

3. Hindlimb(HL) cortex area에서의 NADPH-d 염색성 변화

대뇌피질의 HL의 NADPH-d 염색성의 변화를 분석하여 본 결과, 정상군의 OD값은 155.98 ± 1.62, 대조군은 147.07 ± 2.73, 실험군 A는 148.78

±2.64, 실험군 B는 152.07±2.01이었다. 정상군에 비해 대조군과 실험군 A는 유의한 감소를 나타내었으며, 실험군 A와 B는 대조군에 비해 증가를 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 3).

Table 3. Staining Intensity of NADPH-d-positive Neurons in the HL of Rats.

Group	Number of slices	Average optical density	Duncan Grouping
Normal	25	155.98 ± 1.62 ¹⁾	A ²⁾
Control	21	147.07 ± 2.73	B
Sample A	22	148.78 ± 2.64	B
Sample B	20	152.07 ± 2.01	AB

1) Data are mean ± SEM of optical density; 2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$; Normal, Fed Group; Control, Fasted Group; Sample A, Fed and Acupuncture Group; Sample B, Fasted and Acupuncture Group.

4. Parietal 1(PAR1) cortex area에서의 NADPH-d 염색성 변화

대뇌피질의 PAR1의 NADPH-d 염색성의 변화를 분석하여 본 결과, 정상군의 OD값은 156.57 ± 2.76, 대조군은 145.86 ± 3.50, 실험군 A는 152.22 ± 2.80, 실험군 B는 148.09 ± 2.93이었다. 정상군에 비해 대조군은 유의한 감소를 나타냈고 실험군 A도 감소를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다. 실험군 A와 B는 대조군에 비해서는 증가를 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 4).

Table 4. Staining Intensity of NADPH-d-positive Neurons in the PAR1 of Rats.

Group	Number of slices	Average optical density	Duncan Grouping
Normal	24	156.57 ± 2.76 ¹⁾	A ²⁾
Control	19	145.86 ± 3.50	B
Sample A	20	152.22 ± 2.80	AB
Sample B	20	148.09 ± 2.93	AB

1) Data are mean ± SEM of optical density; 2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$; Normal, Fed Group; Control, Fasted Group; Sample A, Fed and Acupuncture Group; Sample B, Fasted and Acupuncture Group.

5. Parietal 2(PAR2) cortex area에서의 NADPH-d 염색성 변화

대뇌피질의 PAR2의 NADPH-d 염색성의 변화를 분석하여 본 결과, 정상군의 OD값은 157.69 ± 1.88, 대조군은 147.73 ± 4.26, 실험군 A는 151.04 ± 2.67, 실험군 B는 152.06 ± 5.27이었다. 정상군에 비해 대조군과 실험군 A는 감소를 나타냈고, 실험군 A와 B는 대조군에 비해 증가를 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 5).

Table 5. Staining Intensity of NADPH-d-positive Neurons in the PAR2 of Rats.

Group	Number of slices	Average optical density	Duncan Grouping
Normal	19	157.69 ± 1.88 ¹⁾	A ²⁾
Control	21	147.73 ± 4.26	A
Sample A	20	151.04 ± 2.67	A
Sample B	15	152.06 ± 5.27	A

1) Data are mean ± SEM of optical density; 2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$; Normal, Fed Group; Control, Fasted Group; Sample A, Fed and Acupuncture Group; Sample B, Fasted and Acupuncture Group.

IV. 고찰

耳鍼療法은 耳廓에 刺戟함으로써 인체 각부의 질병을 치료하는 分區鍼法으로 古代 東洋醫學을 근거로 광범하게 활용되는 전문의술로 발전되어 왔다¹⁵⁾. 《黃帝內經·靈樞》²⁰⁾에서는 “十二經脈, 三百六十五

絡, 其血氣皆上於面而走空竅, 其精陽氣上走於目而爲睛, 其別氣走於耳而爲聽.”이라 하였고, 《六科證治準繩》²¹⁾에서도 “耳屬足少陰腎經, 又屬手少陰心經, 又屬手太陰肺經, 又屬足厥陰肝經, 又屬手足少陽三焦膽手太陽小腸經之會, 又屬手足陽明大腸胃經, 又屬足太陽膀胱經, 又屬手足少陰心腎太陰肺脾足陽明胃絡”이라 하였는데, 이와 같은 서술을 통해 耳와 臟腑經絡과의 관계가 직접 혹은 간접적으로 밀접한 관계에 있음을 알 수 있다. 특히 臟腑 중에서도 心과 腎과의 관계를 古人들은 중시하면서 元神之府이면서 精髓之海가 되는 뇌와 耳의 관계를 밀접하게 연관지어 설명하였다¹⁵⁾. 현대와 같은 耳鍼療法은 프랑스 의사인 P. Nogier가 개발한 것으로 耳部에 화상을 입음으로써 좌골신경통이 치료되었다는 말에 암시를 얻어 임상에서도 양호한 효과를 얻게되어 이를 1956년 Marseille에서 개최된 국제침구의학회에 보고함으로써 시작되었다. 이는 耳部의 해부학적 특징을 인정하고 臟腑에 질병이 있을 때 耳로 반사되어 분포되어 있는 耳穴이 발현함을 관찰하고 耳穴의 분포와 정확한 위치를 탐측하여 이것을 체계화시켰으며, 귀의 모양이 흡사 태아가 드러누운 형상과 같아 이를 기초로 하여 연구를 진행한 것이다¹⁵⁾. 耳鍼의 효과에 대한 신경생리학적 원리를 현대의학적 관점으로 볼 때 체계화된 정설은 밝혀지지 않았으나 주로 신경해부학적으로 耳廓 부위를 통과하는 미주신경, 안면신경, 설인신경 등의 신경 노선의 분포로써 지체에 대한 치료효과를 설명하고 있으며, 아울러 耳穴의 자극이 대뇌의 시상-뇌하수체 계통을 통과하면서 호르몬에 영향을 미쳐 지체의 각종 반응을 일으킨다는 Thalamus-Pituitary gland 계통학설로서도 그 효과가 이해되어지고 있다¹⁵⁻¹⁶⁾. 耳鍼의 신체에 대한 효과는 소화기, 호흡기, 순환기, 신경계, 비노생식기계, 내분비계, 외과질환, 산과질환, 오펜과질환, 구강과질환, 안과질환 및 피부과질환 등 광범위하게 응용될 수 있으며, 특히 본 실험

에서 사용된 胃點은 耳甲介腔部에 위치한 穴位로서 식욕과 관련하여 식욕억제와 식욕항진의 조절작용이 있다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

음식섭취는 복합적인 행동으로 자신이 처한 환경에서 음식의 可用上에 대한 탐색에서부터 시작하여 씹고 삼켜서 소화시키고 흡수하는 과정까지 다양한 단계의 복잡한 행동과 생리적 과정을 거쳐 이루어지게 된다. 음식섭취의 과정은 관점에 따라 말초적인 조절 과정과 중추적인 조절 과정으로 나누어 볼 수도 있고 음식섭취의 시작과 종료로 나누어 생각할 수도 있다²²⁻²³⁾. 음식섭취 조절에 있어 말초적인 조절에 대한 가설은 말초적인 수준에서의 신호가 중추신경계로 전달되며 이것이 음식섭취의 시작이나 종료에 관여한다는 것이다. 이러한 말초적인 신호로는 혈당치의 변화(glucostatic theory)²⁴⁾, 체온의 변화(thermostatic theory)²⁵⁾, 혹은 체지방 축적량의 변화(lipostatic theory)²⁶⁾ 등이 있고 이외에 아미노산치의 변화(aminostatic theory)²⁷⁾ 및 퓨린치의 변화²⁸⁾ 등이 있다. 또한 음식의 섭취에 따른 위장관의 확장, 위에서의 삼투압의 변화, 위장관벽의 긴장도의 변화, 십이지장의 호르몬 활동 변화 및 간의 당수용체의 활동 변화 등도 음식섭취의 조절에 관여하는 말초적인 신호로서 거론되어 왔으며 최근에는 이러한 요소들이 다양하게 작용하여 조절에 관여한다는 소위 다요인 조절가설이 널리 받아들여지고 있다. 중추신경계에서 전통적으로 음식섭취 조절에 관여한다고 알려진 구조물로는 시상하부와 뇌간 등이 있다. 특히 시상하부가 관심을 많이 받아 왔는데 외측시상하부(lateral hypothalamus)의 파괴는 음식 섭취의 저하를 일으킨다고 알려졌고²⁹⁻³⁰⁾ 반대로 시상하부의 배내측핵(ventromedial nucleus)의 파괴는 음식의 과다 섭취와 비만을 야기한다고 알려져³¹⁻³²⁾, 이 두 곳이 음식섭취 중추(feeding center)로써 소위 섭식조절에 있어 이원적 중추가설(dual center hypothesis)로 알려지게

되었다. 그런데 이렇게 음식섭취의 조절과 상관이 있다고 알려진 외측시상하부는 도파민계 활동과 연관이 있는 nigro-striatal bundle과 해부학적으로 깊은 상관이 있고 배내측 시상하부핵은 세로토닌계의 raphe nuclei tract 및 ventral adrenergic bundle(VAB)와 깊은 상관이 있다는 것이 밝혀지면서 이들 신경전달물질이 음식의 섭취와 식욕의 조절에 있어 어떤 역할을 하는가에 대한 관심이 증가하게 되었고 따라서 각종 신경전달물질에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다^{1-9,14,23,28,31-32}. 이러한 연구 경향에 최근 세포내의 분화와 세포내 신호 전달 등의 중요물질로 알려지고 있는 NO가 신경계의 화학적 신호 전달물질로서, 음식섭취와 조절에 어떠한 영향을 주는가에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁻⁹.

NO는 자유롭게 확산하는 가스로서 신경계, 혈관계 및 면역계에서 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 역할을 한다³³. 1990년 초에 동물세포에서 세포간의 메신저로서 생성된다는 것을 발견하였고 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다³⁴. 즉 NO는 혈소판내에서 혈소판의 응집을 억제하며 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다. 혈관확장을 매개하는 물질로서 뇌 조직에서는 확인되지 않았으나 대뇌혈류순환은 NO에 의해 조절되며 NO는 내피세포 뿐만 아니라 혈관주위 신경섬유에서 나오는 것으로 확인되었다. 또한 신경계에서 NO는 장기기억의 역행성전도물질로 작용할 것으로 생각되며 NO가 과도 생성될 경우에는 신경독소로 작용한다고 알려져 있다³⁵.

NOS는 NO를 만드는 효소로서 그 작용에 대한 것은 확실히 알려진 바가 없다. 1981년 이전까지 NO의 생성은 특정한 세균의 질소화 과정에서 발생

되는 것으로 생각되었으나 Moncada³⁶ 등은 NO가 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 NOS에 의하여 생성된다는 사실을 밝혔다.

NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로 NADPH-d 조직화학을 사용하는데 이 방법은 NOS가 nitroblue tetrazolium(NBT)을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-d 활성작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다. 이 작용에는 꼭 NADPH가 필요하며 NOS는 NADPH를 전자 공여자로 필요로 한다. NADPH-d 활성은 NOS 없이도 부신피질과 신장에서 나타날 수 있지만, 대뇌피질과 선조체에 분포하는 NADPH-d 함유신경원은 NOS와 일치하는 것으로 알려졌다³⁷⁻³⁸. 즉 NO를 만드는 효소인 NOS를 함유한 신경세포는 NADPH-d 조직화학을 통하여 염색할 수 있으며 NOS의 효소활성은 NADPH-d 활성도와 비례한다는 보고³⁹가 있어 본 실험에서 NADPH-d의 염색성을 영상분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다.

NO와 음식섭취에 관한 최근의 발표를 살펴보면 주로 NOS에 의해 연구되고 그 중에서도 NOS inhibitor의 변화를 측정하여 간접적으로 NO의 음식섭취에 대한 영향을 관찰하였다. Vozzo² 등은 NOS inhibitor의 음식섭취에 대한 영향을 관찰하기 위해 NOS inhibitor인 N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)를 24시간 절식시킨 실험동물의 복강내에 주입한 후 24시간 동안 먹이를 주면서 NO 생성의 기질물질인 L-arginine 및 saline을 주입한 군과 음식섭취량을 비교한 결과 L-NAME를 주입한 군에서 21~30%의 음식감소 효과를 관찰하였고 아울러 뇌의 시상하부와 피질, 간에서도 NOS의 활성이 감소됨을 관찰하면서 NOS inhibitor가 음식섭취를 감소시킨다고 발표하였다. Morley³ 등은 연령에 따른 NO의 시상하부에서의 활성을 NOS inhibitor를 통해 연구한 결과 각각 연

령에 따라 다른 효과를 보이면서 증감한다고 보고하였고, Michael⁴⁾ 등은 NOS의 시상하부에서의 활성이 정상체중의 쥐에 비해 비만한 쥐에서 감소되었다고 보고하였다. 또한 NO의 음식섭취와 관련된 modulator로 작용하는 물질에 대한 연구에 있어서 Calapai⁵⁾ 등은 adipocyte에서 분비되는 호르몬으로 지방조직의 크기 조절 및 포만감과 에너지 대사에 영향을 미치는 leptin의 NOS와 관련된 음식섭취행동을 mouse의 뇌실에 leptin을 주입하면서 음식 섭취량과 몸무게의 변화를 관찰하였다. 실험 결과 leptin의 주입은 뇌내 NOS 활성도를 감소시켰는데 이것은 뇌에 분포되어 있는 L-arginine 및 NO의 경로가 음식섭취의 행동에 있어 leptin의 효과와 관련되어 있음을 알 수 있게 하는 결과라고 보고하였다. 이러한 보고들은 NO가 음식섭취 조절에 관련되어 있다는 것을 보여주는 것이라 할 수 있고 실제로 Monda 등⁶⁻⁷⁾도 hypophagia와 hyperphagia를 유발한 흰쥐의 대뇌피질에서 발현되는 NO의 활성화에 대해 연구하면서 분명 NO가 음식섭취 행동을 조절하는 기전에 생리학적 매개체로 작용할 것이라는 실험결과를 제시하였다.

鍼刺戟이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 국내 연구는 최근에 신경전달 물질과 관련지어져 활발히 진행되고 있다. 손¹³⁾ 등은 鍼刺戟을 가한 실험군의 대뇌 활성도를 컴퓨터 영상분석기를 사용하여 동위원소 standard와 비교 분석한 결과 실험군 뇌세포의 여러 구역에서 활성이 증가된 것을 관찰하였고, 특히 진통효과에 있어서 鍼刺戟의 전달 통로가 된다고 추측하고 있는 arcuate nucleus와 median eminence 부위에서 유의한 optical density의 차이를 관찰하였다. 김¹¹⁾ 등은 電鍼刺戟이 뇌의 신경전달물질에 미치는 영향에 대해 電鍼刺戟 후 NADPH-d 신경세포와 NPY 신경세포의 염색성을 관찰한 결과, NOS와 NPY가 電鍼刺戟 부위에 따라 각각 다른 신경세포의 변화를 보여, 신경전달물질에

따라서 電鍼刺戟에 의한 영향을 받는 기전이 다를 것이라는 결론을 지으면서 電鍼療法이 중추신경계의 수많은 peptidic system를 활성화시킨다는 가설을 제시하였다. 또한 김¹⁴⁾ 등은 耳鍼刺戟의 신경전달물질에 대한 영향을 연구, 특히 음식섭취와 관련된 인자인 cholestykinin(CCK)의 변화를 관찰하였는데 耳鍼刺戟 후 대뇌피질 대부분의 영역에서 유의한 증가를 나타내어 CCK가 耳鍼刺戟에 의해 신경세포의 변화를 가져올 수 있으며, 신경전달물질이 鍼刺戟에 의해서 활성화될 수 있다는 가능성을 보여주었다. 즉 耳鍼療法이 음식섭취와 관련되어 있다고 추정되어지는 신경전달물질 중의 하나인 CCK의 활성변화에 영향을 줄 것이라고 제시하였다.

NADPH-d 신경세포를 densitometry로 측정본 실험에서, RSG/RSA 영역의 NADPH-d 염색성을 측정된 결과 대조군은 정상군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소를 보였으며, 실험군 A와 B는 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가를 보였다. 즉 정상군에 耳鍼刺戟을 가한 실험군 A는 유의성은 없었으나 정상군에 비해 염색성의 감소를 보였으며, 대조군에 耳鍼刺戟을 가한 실험군 B는 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 염색성의 증가를 보였다.

FR1/FR2 영역에서 염색성을 측정된 결과 대조군은 정상군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소를 보였으며, 실험군 A와 B는 유의성은 없으나 정상군에 비해서 감소하는 경향이 있었고 대조군에 비해서는 증가하는 경향이 있었다. 즉 실험군 A는 유의성은 없었으나 정상군에 비해 염색성의 감소를 보이는 한편, 실험군 B는 대조군에 비해 염색성의 증가를 보였다.

HL 영역에서 염색성을 측정된 결과 대조군과 실험군 A는 정상군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 감소를 보였으며, 유의성은 없으나 실험군 B는 대조군에 비해서 증가하는 경향이 있었다. 즉 실험군

A는 유의성($p < 0.05$) 있는 염색성의 감소를 정상군에 비해 나타내었고 실험군 B는 유의성은 없었으나 대조군에 비해 염색성의 증가를 나타내었다.

PAR1 영역에서 염색성을 측정한 결과에서 대조군은 정상군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 보였고, 유의성은 없으나 실험군 A는 정상군에 비해 염색성이 감소하는 경향을 나타내었고 실험군 B는 대조군에 비해 염색성이 증가하는 경향을 보였다.

PAR2 영역에서 염색성을 측정한 결과에서는 유의성 있는 결과는 없었으나 대조군은 정상군에 비하여 염색성이 감소하는 경향을 보였으며, 실험군 A는 정상군에 비해 감소하는 경향을, 실험군 B는 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었다.

상기의 실험 결과에 있어, 대조군은 정상군에 비해 PAR2 부위를 제외한 대부분의 대뇌 피질에서 유의성($p < 0.05$) 있게 감소된 NADPH-d 염색성을 보였다. 또한 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 보인 HL 영역을 포함한 전 영역에서 정상군에 鍼刺戟을 가한 실험군 A는 정상군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 이러한 정상군에 대한 대조군의 현저한 저하와 鍼刺戟에 의한 염색성 저하 경향은 절식 stress와 鍼刺戟에 의한 stress 자체가 음식섭취에 관련된 NO의 활성화에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 보여주는 것으로서, Cassidy 등⁴⁰⁻⁴¹⁾의 연구에서도 우울증 환자의 75%에서 체중감소를 호소하고 90%가 식욕부진을 호소하였으며 체중의 증가는 10% 이하에 불과하였다고 연구 결과를 보고하였다. 즉 stress는 음식섭취 및 체중변화에 중요한 인자인 동시에 본 실험의 결과로 NO의 활성화에 영향을 줄 수 있다고 추정되어진다.

정상적으로 음식을 섭취하며 耳鍼刺戟을 한 실험군 A는 정상군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타낸 HL 영역을 포함한 모든 영역에서 염색성의 감소를 나타내었다. 최근 NO의 음식섭취와 관

련된 Vozzo 등^{2,8)}의 연구에서 NO 합성인자인 NOS의 억제물질이 음식섭취 행동을 억제한다는 보고와 연관지어 이 결과를 보면, 耳鍼刺戟이 NOS의 inhibitor로써 작용하면서 NO의 활성화에 영향을 줄 수 있고, 아울러 중추신경계 수준에서 음식섭취 행동의 조절에 영향을 줄 수 있다는 가능성을 제시할 수 있다고 생각된다.

한편, 절식 stress를 받으면서 耳鍼刺戟을 한 실험군 B는 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)을 보이며 증가한 RSG/RSA 영역을 포함한 모든 영역에서 염색성의 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 앞서 정상적 조건하에서 耳鍼刺戟을 실시한 군과는 달리 耳鍼刺戟이 절식 stress라는 조건하에서는 NO를 증가시키려는 방향으로써 활성화에 영향을 줄 수 있다는 가능성을 보여준 결과라 할 수 있다. Stricker-Krograd⁷⁾ 등도 NOS inhibitor인 L-NAME를 obese rats와 lean rats에 각각 주입하여 음식섭취 행동을 관찰한 결과, obese rats에서는 현저한 음식섭취 감소가 관찰되었으나 lean rats에서는 음식섭취 행동에 변화가 없음을 관찰하였다. 이러한 연구는 음식섭취 행동에 대한 NO의 활성화가 실험동물의 종류와 조건에 따라 각각 다르게 나타날 수 있음을 제시한 것이고, 또한 본 실험에서의 耳鍼刺戟도 절식 stress라는 조건하에서는 정상적인 조건과는 다른 NO의 활성화를 일으킬 수 있다고 생각되어진다.

이상의 결과로 보아 耳鍼刺戟이 NADPH-d 신경세포에 변화를 줄 수 있음을 관찰할 수 있었으며, 뇌세포에 존재하는 NO가 耳鍼刺戟에 의해서 활성화될 수 있다는 가능성을 제시할 수 있었다. 결국 韓醫學에서 치료법 중의 하나로 사용되는 耳鍼療法이 음식섭취와 관련이 있다고 추정되어지는 신경계 세포사이의 메신저 물질인 NO의 활성화변화에 영향을 준다는 가능성을 제시할 수 있으며, 향후 음식섭취와 관련된 비만 및 식욕저하에 대한 耳鍼의 영향

력을 지속적이며 다각적인 방향으로 연구해야 할 것으로 사려된다.

V. 결론

耳鍼이 SD계 흰쥐 대뇌 피질의 NO에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NADPH-d 조직화학을 통한 RSG/RSA, FR1/FR2, HL, PAR1, PAR2 영역의 염색성을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RSG/RSA 영역에서 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 실험군 A는 정상군에 비하여 감소하였고 실험군 B는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

2. FR1/FR2 영역에서 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 실험군 A는 정상군에 비하여 감소하였고 실험군 B는 대조군에 비하여 증가하였다.

3. HL 영역에서 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 실험군 A는 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고 실험군 B는 대조군에 비하여 증가하였다.

4. PAR1 영역에서 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 실험군 A는 정상군에 비하여 감소하였고 실험군 B는 대조군에 비하여 증가하였다.

5. PAR2 영역에서 대조군은 정상군에 비하여 감소하였으며, 실험군 A는 정상군에 비하여 감소하였고 실험군 B는 대조군에 비하여 증가하였다.

이상의 실험결과 耳鍼은 음식조절에 관여하는 대뇌피질에서의 NO의 활성변화에 영향을 줄 수 있었다. 따라서 耳鍼療法을 활용하여 음식조절을 필요로 하는 비만이나 식욕부진 등의 치료에 응용할 수 있을 것이라 사려된다.

VI. 참고문헌

1. Jequier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev.* 1999; 79:451~480.
2. Vozzo R, Wittert GA, Chapman IM, Fraser R, Hope PJ, Horowitz M, Alshaher MM, Kumar VB, Morley JE. Evidence that nitric oxide stimulates feeding in the marsupial *Sminthopsis crassi-caudata*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999;123(2):145~151.
3. Morley JE, Vijaya B, Michael B, Sue Farr, Patricia MK, James F. Inhibition of feeding by a nitric oxide Synthase inhibitor, effect of aging. *European Journal of Pharmacology.* 1996;311: 15~19.
4. Morley JE, Michel B. Nitric Oxide Synthase levels in obese Zucker rats. *Neuroscience Letters.* 1996;209 : 137~139.
5. Calapai G, Corica F, Allegra A, Corso-nello A, Sautebin L, De Gregorio T, Di Rosa M, Costantino G, Buemi M, Caputi AP. Effects of intracerebroventricular leptin administration on food intake, body weight gain and diencephalic nitric oxide synthase activity in the mouse. *Br J*

- Pharmacol. 1998;125(4):798~802.
6. Monda M, Viggiano A, Sullo A, De Luca V. Nitric Oxide reduces hypophagia induced by threonine free diet in the rat. Brain Res. 1998;808(2):129~133.
 7. Stricker-Krongrad, Beck, Burlet. Nitric oxide mediates hyperphagia of obese Zucker rats. Life Sci. 1996;58(1):9~15.
 8. Morley JE, James F. Evidence that NO modulates food intake in mice. Life Sci. 1991;49:707~711.
 9. Ueta Y, Levy, Chowdrey HS, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in the rat paraventricular nucleus by food deprivation is independent of serotonin depletion. J Neuroendocrinol. 1995;7(11) : 861~865.
 10. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. N. ENGL.J.MED. 1993;329: 2002~2012.
 11. 김창환, 김용석, 허영범, 유진화. 電鍼刺戟이 SHR 흰쥐 大腦의 NADPH-diaphorase와 Neuropeptide Y 神經細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999;16(4):283~291.
 12. 안성훈, 구성태, 도진우, 김종성, 김광수, 양범식, 김경식, 손인철. 灸津이 免疫細胞에서 iNOS合成에 미치는 影響. 大韓經絡經穴學會誌. 2000;17(1): 33~46.
 13. 손낙원, 원관, 손영주, 김용석, 박영배. 鍼刺戟이 中樞神經系에 미치는 影響에 대한 映像化 研究. 全國韓醫學學術大會. 2000:75~76.
 14. 김이화, 김연정, 임백빈, 장미현, 정주호, 김창주. 耳鍼이 絶食시킨 흰쥐의 大腦皮質에서 CCK 活性變化에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(3) :168~175.
 15. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學敎室. 鍼灸學. 서울:集文堂. 1997:198,480,484,1051,1285,1453.
 16. 管遵信. 中醫耳鍼學. 上海:上海科學技術出版社. 1995:427~429.
 17. 徐有強. 肥滿症의 中醫鍼灸現況. 中醫雜誌. 1990:53~55.
 18. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed.. San Diego: Academic Press. 1985.
 19. 박순영. 의학통계학. 서울:경희대학교출판국. 1998:162~183.
 20. 傳統醫學研究所. 今昔黃帝內經(靈樞). 서울:成輔社. 1995:58,316.
 21. 王肯堂. 六科證治準繩. 서울:大成文化社. 1992:487~488.
 22. Burrows GD, Beumont PJV, Cacper RC. Handbook of Eating Disorders. part I. New York:Elsevier Science Publishers. 1988:23~43.
 23. Essman WB. Serotonin in Health and Disease. Clinical application, Spectrum Publishing. 1979;15:403~450.
 24. Mayer J. Regulation of energy intake and body weight, glucostatic theory and lipostatic hypothesis. Ann Ny Acad Sci. 1955;63: 15~43.
 25. Novin D, Wyrwicka W, Bray G. Basic Mechanisms and Clinical Implications. Raven Press. 1976:77~88.
 26. Mogenson GJ. Neural mechanisms of hunger, current status and future prospects:Novin D, Wywicka W, Bray G. Hunger, Basic Mechanisms and Clinical Implication. New York :Raven Press.

- 1976:473~485.
27. Harper AE. Protein and aminoacids in the regulation of food intake:Novin D, Wywicka W, Bray G. Hunger, Basic Mechanisms and Clinical Implication. New York:Ravev Press. 1976:103~114.
 28. Levine AS, Morley JE. Purinergic regulation of food intake. Science. 1982 ; 217:77~79.
 29. Teitelbaum P, Epstein AN. The lateral hypothalamic syndrome, recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamiclesion. Psychol Rev. 1962; 69 :74~90.
 30. Smith OA. Electrode holders in chronic preparation:Sheer DA. Electrical Stimulation of the Brain. Texas : University of Texas Press. 1961:54.
 31. Hertherington AW, Ranson SN. Hypothalamic lesion and adiposity in rat. Anat Rec. 1940:78:149~172.
 32. Brobeck Jr, Tepperman J, Long CNH. Experimental hypothalamic hyperphagia in albino rat. Yale J Biol Med. 1943; 15:831~853.
 33. Giatgen A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -Cell. New Physiol Sci. 1999; 14:49~53.
 34. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News. 1993:26~38.
 35. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins. Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J Neurosci. 1993;8:2153~ 2163.
 36. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide, Physiology. Pathology and Pharmacol Rev. 1991;43:109~142.
 37. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci. 1991;88: 7797~7801.
 38. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci. 1991;88: 2811~2814.
 39. Bicker G. NO News from insect brains. Trends Neurosci. 1998; 21: 349~355.
 40. Cassidy WL, Flanagan NB, Spillman M, Cohen ME. Clinical observation in manic depressive disease. J Am Med Assoc. 1957; 164:1535~1546.
 41. Woodruff RA, Murphy GE, Herjanic M. The natural history of affective disorder. Symptom of 72 patients at the time of index hospital admission. J Psychiatry Res. 1967 ;5:255~263.