

원 지

巨刺法에 의한 電鍼刺戟이 白鼠의 formalin 誘發 痛症에 對한 抑制機轉

류영수

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Contralateral Heterotropic Electroacupuncture Modulates Formalin Induced Pain in the Rat

Yeoung-Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : In this study, we investigated the effect and pathway of contralateral heterotropic electroacupuncture (EA) on pain induced by formalin in rats.

Methods : Acu-points in the right forepaws, HT 7 and PC 7 were stimulated with 3~4mA, 2ms, and 10Hz after 5% formalin (50ul) s.c. injection to the left hind paw. In addition, it was investigated whether the dorsolateral funiculus (DLF), known to be related the descending inhibition, mediates analgesic effects of the contralateral heterotropic EA or whether administration of naltrexone, an opioid antagonist, blocks the effect of EA.

Results : The results showed that contralateral heterotropic electroacupuncture (EA) inhibited late phase (63.311.7%) of pain induced by formalin in the behavioral test, but sham-EA had little effect on pain behavior (85.616.8%) and no analgesic effects after transection of the dorsolateral funiculus (95.718.7%). The pretreatment of naltrexone (10mg/kg, i.p.) could not inhibit the analgesic effects of EA on formalin-induced pain behavior (70.713.1%). Also, EA suppressed formalin injection induced expression of cFos like protein (cFL) in the dorsal horn, but not sham-EA. Suppressed expressions of cFL in the spinal cord were eliminated after transection of the ipsilateral dorsolateral funiculus at T10-11 levels. However, pretreatment of naltrexone could not prevent the suppressive expressions of cFL at the spinal cord.

Conclusions : These results suggest that the analgesic effect of contralateral heterotropic electroacupuncture may be modulated through the dorsolateral funiculus constituting the descending inhibition. (*J Korean Oriental Med 2003;24(2):193-203*)

Key Words: Contralateral heterotropic, EA, formalin, pain, naltrexone, DLF, c-fos

서 론

진통작용을 얻기 위한 한의학적 치료방법인 침구 치료는 단순히 모든 통증에 획일적이고 동일한 방법을 적용하지 않았다. 즉, 통증의 부위와 통증의 성격에 따라 침구치료의 적용부위와 방법이 달리 적용되었다. 이러한 침구치료 이론 중, 고대 중국의학서인 <

· 접수 : 2003년 3월 20일 · 논문심사 : 2003년 4월 12일
· 채택 : 2003년 5월 6일
· 교신저자 : 류영수, 원광대 전주한방병원 신경과 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1번지
(Tel. 063-270-1021, Fax. 063-270-1199, E-mail: ysllyu@wonkwang.ac.kr)

素問 調經論>”, “痛在於左 而右脈病者 巨刺之”, 이라 하여 거자법을 제시하였으며 이는 임상에서 각종 통증이나 뇌혈관질환으로 인한 신경학적 장애등에 많이 활용되고 있다²⁾.

거자법은 통증유발 부위와 해부학적으로 상관없는 遠位 부위에 대한 침구자극이 통증이나 마비 등을 억제할 수 있는 근거로, 거자법과 관련하여 최근 spinothalamic track와 dorsal horn neurons of spinal cord들이 그들의 peripheral receptive field과 상관없는 다른 영역 (heterotropic area)의 다양한 자극에 의하여 흥분성이 억제될 수 있다는 결과들이 보고 되는 등 많은 연구³⁾들이 진행되고 있다.

formalin test 는 유해성 통증에 대한 진통약물의 효과 여부를 측정하는데 광범위하게 사용되고 있는 방법이다⁴⁾. 아울러 formalin반응은 peripheral sensory c-fibers 와 dorsal horn level에서 spontaneous activity를 증가시키며 glutamate, substance P 및 NO와 같은 neurotransmitters 분비를 증가시키기도 하는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

c-fos는 신경세포에서 발현되는 immediate early gene 중의 하나로 다양한 유해성 자극에 대한 통증 정도를 확인하는데 활용되고 있다 c-Fos 단백질은 자극에 대한 반응으로 30분 이내에 c-fos mRNA 발현과 1~3시간 사이에 단백질의 관찰로 신경세포의 활동성 및 흥분성을 확인할 수 있는 표식자로 이용되고 있다⁸⁾.

本 研究는 흰쥐의 formalin pain을 유발한 후, 통증이 유발된 말초 수용야와 거리가 먼 영역에 대한 電鍼刺戟이 진통효과를 유발하는지를 관찰하고, 아울러 이러한 진통작용의 경로가 무엇인지를 밝히고자 하였다. 이를 위해 요척수 후각에서의 cFos 발현을 중심으로 진통의 경로로 일반적으로 알려진 척수의 배측외측 (dorsolateral funiculus)과 central nervous system의 opioid receptor의 작용을 억제하였을 때 거자법을 근거로 한 전침자극의 효과가 어떻게 변화하는지를 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻게 되었다.

방 법

1. 실험동물

약 250-300g의 78 male albino sprague-dawley rats 를 cage마다 4-5마리로 그룹을 지정하였으며, 12시간 간격으로 빛과 어둠을 교환해 주면서 음식과 물을 자유롭게 주었고 실험 1주일 전부터 환경에 적응할 수 있게 하였다. 아울러 research protocols 은 the institutional animal care and use committees에 의해서 승인되었고 통증에 관한 국제 윤리위원회의 윤리 지침을 준수하여 동물 실험이 수행되었다.

2. 마취

외과적인 절차에 있어 동물들은 100% 산소상태(at 2L/min) 에서 3% halothane (2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane, Sigma-Aldrich Inc, U.S.A.)으로 깊이 마취되었고 실험이 진행되는 동안에는 0.5% halothane 상태를 유지하였다.

3. Formalin induced pain

Formalin induced pain model 은 27-G 바늘로 5% Formalin 용액 50μl를 sural nerve territory(the plantar aspect of left hind paws)에 피하 주사하였다.

4. Electro-acupuncture

Two stainless steel needle (0.25mm diameter)을 우측 신문혈 (HT 7, On the transverse crease of the wrist, radial to the tendon of m. flexor carpi ulnaris)과 대릉혈 (PC 7, On the transverse crease of the wrist, between the tendon of m. palmaris longus and m. flexor carpi radialis) 에 3-5 mm 깊이로 transcutaneously 하게 삽입되었다. 이어서 Electro-acupuncture (3-4 mA, 2 ms duration and 10 Hz, lasting 30 min)를 30분 동안 계속해서 일정한 자극으로 전침을 시행하였다(stimulator, PulseMaster A300, WPI, U.S.A). 그리고 신문혈 및 대릉혈의 전침효과와 sham EA를 비교하기 위해 ipsilateral forelimb의 elbow area(소해혈, HT 3)에 30분 정도의 전침 자극을 시행하였다.

5. Behavioral Test

Behavioral Test 은 Formalin 주사 후에 시작되었고 60분 동안 계속되어졌다. 동물들은 깨끗한 plexigal cylinder(25x25x25 cm) 안에서 관찰되었고 동시에 video tape으로 기록되었다. 관찰하는 동안 shaking, lifting, rearing, biting, grooming 과 같은 비정상적인 행동들이 5분 간격으로 기록되었다. composite pain score(CPS)는 먼저 category weights (category 1, 2 and 3, respectively)에서 부여된 behavioral category 에 소비된 시간의 양(sec)을 적용하여 총합을 구함으로써 산출하였다(WST). 이 중 통증반응양상이 심한 두 번째와 세 번째 범주의 두 단계에 대하여 각각 category 2와 3의 가산점을 부과하여 각각 소비한 시간과 횟수를 합산함으로써 유도하였다. 이러한 계산 방법을 Weighted scores technique (WST)라고 부르며, 본 실험에서는 CPS를 WST로 대체하였다.

$$WST = \{(2 \times \text{time in category 2}) + (3 \times \text{time in category 3})\} / 300$$

(category 1 = the injected paw has little or no weight on it. category 2 = the injected paw is elevated and is not in contact with any surface. category 3 = the injected paw is licked, bitten or shaken). CPS = $\{(2 \times \text{time in category 1}) + (3 \times \text{time in category 2})\} / 300$

6. Lesion of the dorsolateral funiculus

T10-11 levels 왼쪽에서의 Spinal lesion 는 halothane-anesthetised 된 실험동물을 이용하였으며, laminectomy 는 척수를 드러내기 위해서 T10-11 levels 왼쪽에서 행했다. dorsolateral funiculus(DLFX) 는 정교한 가위로 해당부분을 절개하였으며 척수 주요 혈관에 미치는 손상을 피하기 위한 치료를 병행했다. dura mater 은 Gelfoam으로 상처는 봉합용 실로 봉합되었다. 모든 동물들은 테스트에 앞서 5일 동안 회복시켰다. 실험의 끝부분에서 척수의 20 μ 정도를 잘라서 제거했고 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색시켜 조직학적으로 입증했다.

7. Naltrexone 전 처치

mu opiate 수용체를 차단시키기 위해 naltrexone hydrochloride(Sigma-Aldrich Inc., U.S.A.) 와 같은 opioid antagonist(10mg/kg, i.p.)를 saline에 희석하여 사용하였으며 test 15분 전에 주입되었다.

8. immunohistochemistry

cFos-like protein(cFL) 발현을 보기위한 immunohistochemistry는 기존 방법을 약간 변형시켜 시행하였다. 모든 동물들은 chloral hydrate(400mg/kg, i.p.)로 깊이 마취시켰고 0.9% 식염수를 고루 뿌렸으며 0.05M Na₂HPO₄와 0.137M NaCl을 포함한 phosphate buffered saline solution(PBS)에 녹인 4% paraformaldehyd 로 고정되었다. 그리고 척수는 spinal L1-5 level 에서 떼어서 PBS에서 후고정하고 rinse 하였으며 4 $^{\circ}$ C에서 1~2일 동안 30% sucrose solution에 담궈 두었다. 조직은 저온 유지 장치에서 40 μ m의 두께로 박편했고 30분 동안 6% H₂O₂에서 incubating 했으며 5% dry milk를 포함한 0.1M PBS로 10분 동안 2번 행군 다음 0.5% bovine serum albumin (PBS BSA)를 포함한 0.1M PBS에 녹인 0.8% triton X-100 과 함께 incubating 했다. 간단한 워싱 후 조직을 primary cFos polyclonal antibody(Ab-2; Oncogene; diluted 1:250)와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 overnight incubating 했다. 다음 날 조직의 절단 부분을 실온에서 한 시간 동안 이차항체(goat anti-rabbit; DAKO)와 ABC Elite Kit(Vector Lab.)를 처리하여 incubating 하고나서 avidin-biotin complex를 처리하고 한 시간 동안 실온에 방치했다. cFL 단백질을 가진 neurons은 0.05% diaminobenzidine HCl과 0.003% H₂O₂에서 incubating 한 조직에서 가시화되었다. DAB 반응 후 조직은 0.1M PB로 행군 후 겔로 코팅된 슬라이드 위에 얹어 놓고 공기로 말리고 탈수, permount로 덮는다. 정량을 위해서 오직 cFL neurons 만이 spinal dorsal horn에서 digital image analysis system을 사용하여 카운트되었다.

9. 통계적인 분석

모든 자료는 mean±S.E.M으로 표현되었다. 유의성 있는 통계차이는 statyiew 4.0을 사용하여 평가되었다. 평균값 사이의 비교는 unpaired student's t-test와 one-way ANOVA에 의해 수행되었으며 $p < 0.05$ 를 유의수준으로 삼았다.

결 과

1. formalin 통증모델 실험동물에서 Electroacupuncture inhibits the pain behavior of formalin induced pain

먼저 정량화된 통증모델의 안정성을 확인하기 위하여, formalin(5%, 50 μ l)을 정상 흰쥐(n=10)의 하지 족저 부위 피하에 주입하고 모든 실험동물에서 flinching, licking와 biting 등과 같은 통증反應 행동을 관찰하여, 통증수치(CPS)로 환산하였다. Formalin 주입 직후부터 5분까지 통증수치(composite pain score)가 1.56±0.20인 제 1차 통증반응(first phase)이 출현하였고, 이후 15분까지는 통증반응이 급격히 감소하는 양상을 보였다. 제 2차 통증반응(late phase)은 fomalin 주입 20분 이후부터 나타나기 시작하여 30분에 1.25±0.15, 35분에 1.54±0.22, 40분에 1.44±0.1, 그리고 45분에 1.20±0.12로 증가하였고, 이후 점차 통증반응이 감소했다. 이같은 실험결과를 통하여 전침자극의 진통효과를 규명하고자 하는 통증반응 검사와 분자생물학적 실험을 수행하는 근거로 삼을 수 있었다(Fig. 1).

2. 거자법 전침자극에 의한 formalin 유발통증 억제 효과

거자법에 근거한 전침자극이 formalin 유발통증 반응을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여, 전침자극군(EA, n=6)과 任意穴 전침자극군(Sham-EA, n=6)에서 통증반응을 관찰하였다. 특히, 대조군(Con)에서 가장 통증반응이 심하게 출현하는 제 2차 통증반응(late phase) 기간 중 30~45분 사이를 관찰 비교하고자 하였다. 전침자극 직후 통증반응을 중심으로 한

진통효과의 비교에서, 전침자극군(EA)의 63.3±11.7% ($p < 0.01$)로 대조군(Con)에 비하여 유의한 진통효과가 관찰되었다. 그러나 임의혈 전침자극군(Sham-EA)에서는 85.6±16.8%로 전침군(EA)와 비교하여 전침자극의 효과가 뚜렷하지 않아, 전침자극의 효과를 명확히 확인할 수 있었다. 이러한 전침자극의 진통경로를 추적하기 위하여, 배외측속(dorsolateral funiculus) 손상군(DLFX, n=6)과 naltrexone 전처치군(Nalt, n=6)에서 formalin 주입후 전침자극을 가하여 행동검사를 각각 실시하였다. 동측의 배외측속 손상군(DLFX)에서 전침자극은 통증반응이 95.7±18.7%로 관찰되어 거의 진통효과가 없는 것으로 관찰되었으며, Naltrexone 전 처리군에서는 70.7±13.1% ($p < 0.05$)로 대조군에 비하여 통증반응이 억제된 것을 확인하였다(Fig. 2).

3. Effects of electroacupuncture on the expression of cFos like protein in the spinal dorsal horn

Formalin 주입후 시간의 경과에 따른 요척수 후각 회백질에서 c-Fos 단백질의 발현양상과 전침자극에 따른 효과를 관찰하기 위하여 formalin 주입후 1시간과 2시간에 각각 제 3-5번 요척수에서 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 것처럼, 정상상태에서는 척수후각에

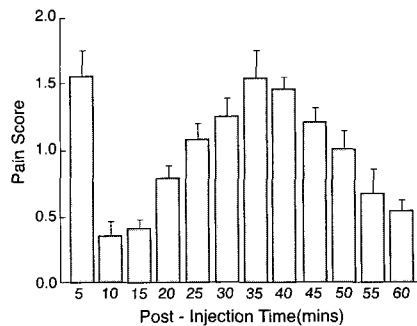


Fig. 1. Mean composite pain score of formalin induced pain at the hindlimb.

CPS = {(2 X time in category 1) + (3 X time in category 2)} / 300; Number of animal was 10. Value is mean±S.E.M.

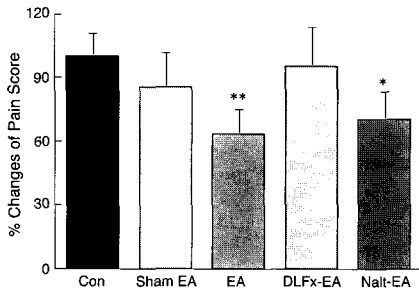


Fig. 2. Effects of electroacupuncture on behavioral response of the late phase in formalin test.

Con, formalin injection to the left hindpaw; Sham-EA, electroacupuncture on the ipsilateral non-acupoints of the forelimb to formalin injection; EA, electroacupuncture on the contralateral acupoints of the forepaw to formalin injection; DLFx-EA, electroacupuncture following transection of the ipsilateral dorsolateral funiculus; Nalt-EA, electroacupuncture following pretreatment of naltrexone(10 mg/kg, i.p.). Number of each group was 6 except control. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control.

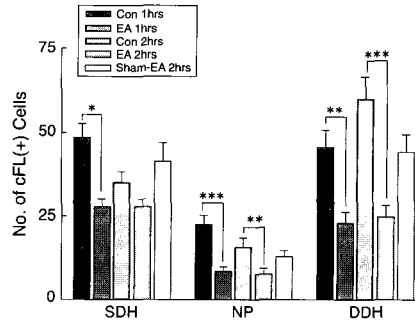


Fig. 3. Effects of electroacupuncture on cFos like protein expression in the spinal cord dorsal horn of L3-5 levels.

Con, formalin injection to the left hindpaw; EA, electroacupuncture on the contralateral acupoints of the forepaw to formalin injection; Sham-EA, electroacupuncture on the ipsilateral non-acupoints of the forelimb to formalin injection; SDH, superficial layer of dorsal horn; NP, nucleus proprius; DDH, deep layer of dorsal horn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the same time of control, respectively.

서 cFos 단백질의 발현이 거의 나타나지 않는다. formalin 주입후 1h에서는 superficial layer에서 48.64 ± 4.19 개, nucleus proprius에서 22.64 ± 2.52 개, 그리고 deep layer에서 45.27 ± 5.41 개가 발현되었다. 그러나 전침 자극군에서는 각각, 27.6 ± 2.89 개 ($p < 0.05$), 8.6 ± 1.24 개 ($p < 0.001$), 23 ± 2.93 개 ($p < 0.01$)로 발현이 유의하게 감소되었다. formalin 주입후 2시간에서는 척수 후각 표층부에서 34.85 ± 3.75 개, nucleus proprius에서는 15.69 ± 2.68 개, 척수 후각 심층부에서 60.15 ± 6.43 개로 1시간에 비하여 심층부에서 큰 증가를 나타내고 있다. 반면 같은 시간대의 전침자극군에서는 각각 27.63 ± 2.83 개, 7.63 ± 1.35 개 ($p < 0.05$), 24.75 ± 3.47 개 ($p < 0.001$)로 심층부에서 가장 큰 감소를 보여주고 있다. 또한 동측(ipsilateral) 상지의 임의경혈부위에 가한 전침자극(Sham EA)에 의하여 진통효과가 있는지를 관찰한 결과에서는 cFos 단백질의 발현이 표층에서 41 ± 5.84 개, nucleus proprius에서 12.63 ± 2.34 개, 심층에서 44.13 ± 5.10 개 ($p < 0.05$)로 나타나, 심층부를 제외하고는 cFos 단백질 발현이 억제되지 않았다. 이로써 동측 상지의 임의 혈 전침자극의 진

통효과는 행동검사와 함께 고려할 때 미약하였다 (Fig. 3).

4. The pathway of contralateral heterotropic EA analgesic effect on formalin induced pain

거자법에 근거한 전침자극으로 족저에 유발된 formalin 통증의 억제효과와 진통경로에 관련한 행동 반응 검사에서 배외측속(dorsolateral funiculus)의 역할이 관여함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 확인하기 위하여 통증유발전에 T10-11 수준에서 동측의 배외측속을 손상시킨 흰쥐에서 cFos 단백질 발현의 변화를 관찰하였으며 T10-11 수준에서 통증유발 부위와 동측인 배외측속의 손상을 확인할 수 있었다. 더욱이, 배외측속 손상군에서 formalin 유발통증에 대한 전침자극의 효과를 관찰하였을 때, 표층에서는 40.57 ± 5.49 개, nucleus proprius에서 14.14 ± 3.29 개, 심층에서 50.43 ± 5.88 개의 cFos 단백질이 발현되어, 정상동물에서 전침자극에 의한 cFos 단백질의 발현 억제효과가 배외측속 손상군에서는 관찰되지 않았다.

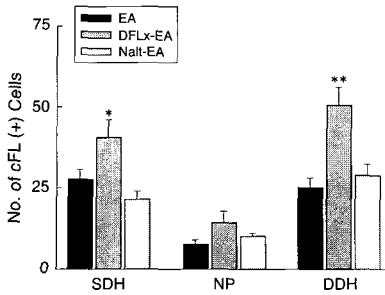


Fig. 4. Effects of transection of the dorsolateral funiculus and pretreatment of naltrexone on cFos like protein expression in the spinal cord dorsal horn of L3-5 levels.

EA, electroacupuncture 2hrs after formalin injection; DLFx-EA, electroacupuncture 2hrs after formalin injection following transection of the ipsilateral dorsolateral funiculus; Nalt-EA, electroacupuncture 2hrs after formalin injection following pretreatment of naltrexone (10 mg/kg, i.p.); SDH, superficial layer of dorsal horn; NP, nucleus proprius; DDH, deep layer of dorsal horn. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with EA, respectively.

또한 Formalin 유발 통증의 行動反應 검사에서 naltrexone 전처리군에서 전침자극을 통한 진통효과가 계속 유지되는 것을 관찰된 점을 바탕으로, 요척수 후각의 cFos 면역 단백 발현양상을 관찰하였을 때, 표층에서는 21.5 ± 2.35 개, nucleus proprius에서는 9.9 ± 0.94 개로 감소된 경향을 나타내었으며, 심층에서는 28.7 ± 3.55 개로 전침 자극군과 같은 수준의 발현억제를 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

전통적인 침구치료는 氣血 및 經絡理論을 바탕으로 循經取穴法, 接經取穴法, 根結論, 通經取穴法과 巨刺法 등을 이용하고 있으며, 이러한 取穴法은 經絡體系를 기초로 痛症을 치료하는 방법으로 제시되고 있다.

巨刺法은 왼쪽에 병이 있을 때 오른쪽 혈위를 취하고, 오른쪽에 병이 있을 때 왼쪽 혈위를 취하여 치료하는 자침법이다. 그 이론적 근거는 <素問 繆刺篇>1), "邪客於經 左盛即右病 右盛即左病 亦有移易者

左痛未已 而右脈先病 如此者 必巨刺之" 라 하여, 질병 부위와 上下左右로 대칭되는 부위에 대한 치료작용을 이론적으로 제시하고 있다.

巨刺法의 원리는 근대에 와서는 <<鍼灸經緯>>에서 董氏對應鍼法이나 董氏奇穴을 통해 효과를 검증하였으며, 오늘날에도 여전히 실용적 가치가 인정받아 뇌혈관장애로 인한 반신불수, 안면신경마비, 요부염좌, 좌골신경통 등에 巨刺法을 이용하여 모두 좋은 임상효과를 보고 있다⁶⁾.

최근 들어 巨刺法과 관련하여 침에 의한 진통 경로가 몇 가지로 제시되고 있다. 첫째로는 뇌간의 Periaqueductal grey (PAG)가 STT의 일부가 연결되어 Nucleus raphe magnus (NRM)와 Nucleus reticularis paraventricularis (Rpv) 등을 거쳐, dorsolateral funiculus (DLF)를 통해 척수 후각으로 연결되어 진통역할을 담당한다는 supraspinal descending pathways이며¹¹⁾, 두 번째로는 Le Bars 등¹²⁾이 마취된 흰쥐에서 척수후각과 삼차신경핵의 폭주성 신경세포 (convergent neurons)의 신경활동성이 흥분된 말초수용영역과는 거리가 먼 신체 다른 영역에 가한 유해성 전기자극에 의하여 억제된다는 diffuse noxious inhibitory controls (DNIC)이다. 아울러 셋째는 뒷늦게 밝혀진 것으로 상위 경추 (upper cervical)의 C1-C2의 nucleus proprius에 존재하는 고유감각성 신경세포들 (propriospinal neurons)이 요척수까지 하행성 투사되어 요척수 (L5-S1) 신경세포의 구심성 흥분을 억제할 수 있다는 propriospinal neurons connecting different spinal cord segments¹³⁾이다.

이외에도, 관문조절설 (Gate Control theory)¹⁴⁾의 segmental neuronal circuits와 Basbaum과 Field¹⁵⁾가 신경조직에 opiate에 대한 수용체들이 진통효과를 일으킨다는 내재진통계 (Endogenous analgesic system)가 존재한다. 그러나 내재 진통계의 경우는 이후 계속된 실험결과들에서, 상기에서 언급한 DNIC, supraspinal descending pathway와 propriospinal projection과 같은 경로와 다양하고 복잡하게 연결되고 있다.

최근 연구에서 lidocaine 또는 DLF의 손상으로 뇌간에서 척수로 하행하는 경로를 제거할 경우, 하지의

염증으로 유발되는 통증반응이 증가하는 것을 보여 주고 있다¹⁶⁾. 아울러 흉추 수준에서 DLF를 손상시켰을 때, formalin 유발통증으로 인한 요추 후각신경세포에서의 cFos 발현이 증가되는 것을 보고하며, DLF에 존재하는 하행성 신경섬유가 유해자극에 의하여 발현되는 cFos를 억제할 수 있다는 것을 주장하였다¹⁷⁾. 이러한 결과는 동측 또는 반대측에 행한 자극이 DLF를 통해 하행성 억제경로를 활성화할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

Le Bars 등¹⁸⁾은 마취된 흰쥐에서 척수후각과 삼차 신경핵의 폭주성 신경세포 (convergent neurons)의 신경활동성이 흥분된 말초수용영역과는 거리가 먼 신체 다른 영역에 가한 유해성 전기자극에 의하여 억제된다는 것을 발견하였으며, 이를 diffuse noxious inhibitory controls (DNIC)라고 칭하였다. DNIC 기전에 대하여, Le Bars 등은 척수후각의 신경세포를 흥분시키는 말초수용영역으로부터 멀리 떨어진 영역에 가한 유해성 자극이 복외측속 (ventrolateral quadrant)를 통해 뇌간을 포함한 상위중추로 신호를 보내어 DNIC 시스템을 흥분시키게 되고, 통증의 하행성 억제노선인 동측의 배외측속 (dorsolateral funiculus)을 통해 척수 또는 삼차신경의 폭주성 신경세포의 활성을 억제한다고 제안하였다¹⁹⁾. 또한 acupuncture와 DNIC를 비교 연구한 실험에서, 족삼리에 가한 전기 자극이 삼차신경 폭주신경원 (trigeminal convergent neurons) 활성을 억제하는 것을 관찰하여, 침자극이 DNIC와 관련된 신경기전을 촉발한다고 주장하였다²⁰⁾. 그리하여, DNIC가 침구치료의 巨刺法 원리와 유사해 보이는 측면을 지니고 있지만, 문제는 진통에 대한 위치 (localization)의 특이성 (specificity) 결여와 DNIC를 유발하는 자극이 유해성이어야 한다는데 있다.

Propriospnal projection에 의한 진통효과에 관련하여, 건측 하지 또는 상지에 가한 유해성 자극, cardiopulmonary sympathetic, splanchnic 과 hypogastric afferents의 전기자극이 lumbosacral 척수시상로의 신경활동성을 억제하는 것이 보고되었다²¹⁾. 이러한 효과에 대하여, 경추의 C1-C2의 nucleus proprius에 존재하는 고유감각성 신경세포들 (propriospnal

neurons)이 요척수까지 하행성 투사되는 것을 확인하였고²²⁾, 아울러 요척수 (L5-S1) 신경세포의 구심성 흥분을 억제를 중개할 수 있다는 것을 밝혀내었으며, 이를 토대로 C1-C2의 고유감각성 척수신경세포들이 하지의 다양한 말초자극에 대한 반응성을 조절하는데 중요할 수 있다고 가설을 내놓았다²³⁾. 더욱이 DNIC가 관련된 brain stem 영역의 구조들이 관련되지 않고, 단순히 propriospinal projection 하행성 경로를 통하여, 진통 관련 물질이 opioid性이라는 점이 현재까지 알려져 있다.

본 연구의 통증모델인 formalin induced pain은 흰쥐의 하지 족저부위에 희석된 formalin을 피하에 주입하여 약물주입 직후부터 약 5분간 발생하는 제 1차 痛症과 이후 痛症반응이 소실된 후 20분~60분 이상까지 지속되는 제 2차 痛症반응을 유발하는 것이다. formalin induced pain의 특징을 살펴 보면, 탈수초 신경인 c-fiber의 흥분성을 증가시키며²⁴⁾, wide dynamic range (WDR) 신경세포를 포함한 감각신경세포들의 자발활동성을 증가시키는 것으로 보고되었다²⁵⁾. 특히 2차 痛症반응 (late phase)은 formalin이 피하에 위치한 痛症감각 수용체들의 직접적인 자극에 의하여 A δ , C 감각신경섬유들이 흥분이 척수 표층부에 존재하는 WDR 신경세포들의 자발활동성을 직접적으로 증가시킴으로써 나타난다고 제시하며²⁶⁾, 척수에서 glutamate²⁷⁾, substance P²⁸⁾, NO²⁹⁾ 등 신경전달물질이 증가되는 것으로 알려져 있다.

c-Fos 단백질은 신경세포에서 발현되는 immediate early gene 중의 하나로 다양한 자극에 의하여 30분 이내에 cfos mRNA 발현과 1~3시간 사이에 단백질의 관찰로 신경세포의 활동성 및 흥분성을 확인할 수 있는 표식자로 이용되고 있다³⁰⁾. 특히 Hunt 등³¹⁾은 처음으로 마취된 흰쥐의 말초부위에 유해성 자극을 가하여 척수에 존재하는 신경세포에서 cFos 단백질을 관찰을 시작하였고, 그 뒤 다양한 유해성 자극에 대한 痛症 정도를 확인하는데 활용되었으며, 흰쥐에서 하지의 피하에 formalin 주입시 척수 및 후근 신경절에서 시간경과에 따른 cFos 단백질의 발현양상 및 척수 부위별 분포양상이 관찰되었다³²⁾. 특히 cFos 단

백질과 formalin 유발통증의 상관관계를 확인한 실험에서는, fos mRNA antisense oligonucleotide를 척수강 주입한 후 흰쥐 척수 후근 신경세포들에서 formalin에 의한 preprodynorphin mRNA의 전사를 억제하고 제 2차 통증반응을 억제한다고 보고³³⁾를 통하여, 통증정도와 cFos 발현량의 비례하고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 formalin 유발통증에서 거자법에 근거한 전침자극의 진통효과 여부를 확인하였다. 그 결과 formalin 주입 직후 가하여진 전침자극이 pain behavioral response를 약 37%까지 억제하였는데, 반면 sham-EA에서는 진통효과가 약 14.4% 밖에 없는 것으로 나타나, 거자법에 의한 전침자극의 특이성(specificity)이 명확해졌다. 또한 이러한 통증반응 억제한 진통효과는 척수수준에서 관찰한 cFos 단백질 발현량도 유의한 수준으로 억제하는 것이 관찰되었다.

현재까지 formalin induced pain에 거자법에 근거한 전침자극의 진통효과를 관찰한 예는 아직까지 보고된 바가 없다. 다만, 족삼리에 가한 전침자극³⁴⁾이나 봉독요법 (bee venom)³⁵⁾이 formalin induced pain을 억제할 수 있다는 연구가 일부 보고 되어있는데, 이는 통증 인근부위의 경혈인 족삼리가 내재진통계와 밀접한 연관성을 가지고 있음을 보여주고 있다. 결국, 이러한 연구 보고들의 바탕에는 이전의 침자극에 의한 진통효과 연구의 방향이 주로 Electro-acupuncture가 내재진통계 (endogenous opioid system)를 자극한다는 주장이 가장 일반적으로 받아들여 지고 있기 때문이다.

EA에 의한 진통효과가 naloxone에 의하여 차단된다는 Mayer의 주장과는 일치하지 않는 의견으로 Watkins 등과 Polmeranz 등³⁶⁾은 EA를 시술하기 전에 opiate antagonist인 naltrexone을 투여하면 진통효과가 억제되는 반면 EA를 시술한 후에 naltrexone을 투여하면 진통효과가 차단되지 않는다는 연구결과를 발표하였다. 이러한 결과에 대해 Pomeranz 등은 endogenous opiate의 일차적인 진통효과와 non-opioid에 의하여 매개되는 이차적인 진통효과가 있음을 언

급하였으며, Chapman 등³⁷⁾은 합곡 자침에 의한 치통의 침진통의 효과가 naloxone에 의한 억제되지 않는 것을 관찰하였다.

본 연구결과에서도 naltrexone의 전처리 동물에서 행동검사에서는 대조군에 비하여 약 29.3%의 진통효과가 관찰되었으며, 요척수의 cFos 단백질의 발현에서도 전침자극군과 마찬가지로 발현이 억제됨으로써 formalin 주입후 전침자극을 가하는 상태에서 발생하는 진통작용에 opioid 수용체가 직접적으로 관여하지 않는 것으로 사료된다.

기존의 연구 결과와 비교하여 볼 때, opioid 수용체가 진통작용을 매개하지 못하는 결과는 본 실험에서 사용되는 통증모델과 전침자극 조건의 차이에서 기인한 것인지를 고려해야 할 것이다. 즉, 침진통이 내재 진통계와 연계된 경우의 대개는 정상동물에서의 침자극과 그에 따른 유해성자극에 대한 반응성을 관찰한 경우가 가장 많으며, 본 연구에서처럼, 이미 통증이 유발된 경우의 진통문제는 침 자극이 진통경로를 활성화시키기 이전에 생체자체가 생리적으로 통증에 대한 억제기전을 활성화시킨 상태라고 보아야 한다. 이 경우 침 자극이 진통경로에 작용하는 문제가 정상상태와는 매우 다를 것이며, 결국 본 연구결과에서 naltrexone 전처리 된 동물에서 formalin 유발 통증에 대한 전침자극의 진통효과가 유의하게 억제되지 않는 이유는 병리적 상태에서 진통경로에 opioid 이외에 많은 인자들이 복합되어 있을 것이라는 추측으로 해석하여야 할 것이다.

다음으로 본 실험 결과와 관련하여 침진통이 앞에서 언급한 하행성 진통경로와 또는 기타 다른 진통경로와의 관계에 대한 기존 연구를 살펴 볼 필요가 있다. Takeshige 등³⁸⁾은 저주파 전침자극이 serotonin mediated pathway와 noradrenergic mediated pathway로 나누어지는 descending inhibitory system에 작용하는 진통경로를 제안하여 침에 의한 진통작용은 내재진통계 보다는 다른 진통경로와의 밀접하다는 것을 예상해 볼 수 있다.

본 연구결과에서는 배외측속(DLF) 손상동물에서 전침자극의 진통경로를 관찰하고자 하였는데,

formalin test전에 T10-11 수준에서 동측의 배외측속을 손상시킨 흰쥐에서 formalin 유발통증에 대한 전침자극의 진통효과가 행동검사에서 관찰되지 않았다. 이러한 경향은 cFos like protein 발현량을 관찰한 실험에서도 같은 반응을 보였다. Takeshige 등³⁹⁾ 과 Fields 등⁴⁰⁾ 이 nucleus raph magnus 신경세포들의 일부 axon이 배외측속 (DLF)을 통해 동측 및 반대측 척수 후각에 종지한다는 것을 보고함을 근거로 본 실험에서 건측(contalateral)에 가한 전침자극의 효과를 이해할 수 있다.

이상의 결과를 통해, 거자법에 근거한 전침자극의 진통효과의 우선순위는 배외측속(dorsolateral funiculus)라는 것이 확인되었다. 그러나 향후 DLF를 통한 진통경로 가능성과 함께 상위중추에 관련한 보다 다양한 연구를 보장하여 propriospinal, DNIC 또는 전통적인 supraspina descending inhibition 인지를 확인하여야 할 것이다. 더욱이, 본 연구 결과 배외측속 (DLF)을 통한 해부학적 경로가 가장 크게 진통경로로 작용하였고, 반면 opioid성 내재진통계는 비중이 약한 것으로 관찰되었다는 점은 기존 연구에서 DLF와 opioid간의 밀접성과는 상충되는 부분이 있다. 물론, 침진통에 관련하여 내재진통계의 역할을 배제할 수 없으나, 최근에 다양한 침진통 경로가 계속하여 언급되고 있는 점과 침진통의 경로가 단순히 하나에 의존하기 보다는 다양한 진통경로를 복합적으로 활용하고 있는 점을 고려할 수 있을 것이다. 이에 본 연구결과는 침진통의 다양성을 추구할 수 있는 점에서 그 의의를 찾을 수 있을 것이라 생각되어진다. 물론 이러한 진통경로에 직접적이고, 강력한 매개 물질을 확인하기 위한 연구가 보장되어야 할 것이다.

결론

本 研究는 흰쥐에게 formalin을 주입하여 痛症을 유발시킨 뒤, 거자법을 근거로 한 電鍼刺戟이 진통효과가 있는지를 관찰하고 아울러 이러한 진통작용의 경로가 무엇인지를 밝히고자 하였다.

1. 전침자극은 formalin induced pain behavioral test에서 관찰된 痛症반응 (late phase)을 유의하게 하였다. 또한 거자법에 근거한 전침자극의 진통경로를 확인하기 위한 통증행동 검사에서, 任意穴 전침자극군 (Sham-EA, 85.6±16.8 %)은 전침자극군 (EA, 63.3±11.7 %)의 비하여 진통효과가 감소하였다. 동측 배외측속 손상군 (DLFx)에서 전침자극은 통증반응이 95.7±18.7 %로 관찰되어 진통효과가 관찰되지 않은 반면, naltrexone 전처리군에서는 70.7±13.1%로 진통효과가 관찰되었다.

2. 요척수의 cFos like protein 발현량을 관찰한 결과에서 formalin 주입후 1시간과 2시간에 관찰된 cFos 면역 단백질 발현이 전침자극에 의하여 척수후각의 superficial laminae, nucleus proprius와 deep laminae에서 모두 유의하게 억제되는 것이 관찰하였다.

3. 전침자극의 하행성 통증 억제경로와의 관계에서 DLF 손상군의 경우, formalin 주입 후 1시간과 2시간에 관찰된 cFos like protein 발현이 전침자극군에서처럼 억제되지 않았으며, 이는 앞서 관찰된 통증행동반응 검사에서와 같은 결과를 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면, 거자법에 근거한 전침자극은 formalin 유발 통증을 억제하는 진통효과를 나타내었고, 이러한 진통경로에는 opioid 수용체의 역할보다는 배외측속 (dorsolateral funiculus)의 역할이 더욱 중요하게 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 향후 진통경로에 대한 구체적인 실험 연구 및 임상에서 거자법에 입각한 각종 통증이나 신경학적 장애에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 홍원식譯: 黃帝內經 素問(校勘直譯), 서울 전통문화연구회, 1994;356:358-359
2. 문상관외 4인: 중풍환자에 있어서 거자법에 대한 유용성 검토, 전국한의학 학술대회 논문집, 1999;222-

- 224.
3. Ammons, W. S.; Girardot, M.-N.; Foreman, R. D. T2-T5 spinothalamic neurons projecting to medial thalamus with viscerosomatic input. *J. Neurophysiol.* 1985;54:73-89.
 4. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992 Oct;51(1):5-17(Review).
 5. Skilling S.R., Smullin D.H., Beitz A.J., and Larson A.A. Extracellular amino acid concentration in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J. Neurochem.* 1988;51: 127-132.
 6. Kuraishi D., Hirota N., Sato Y., Hanashima N., Takagi H., and Satoh M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. *Neuroscience*, 1989;30:241-250.
 7. Haley J.E., Kickenson A.H., and Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology*, 1992;33:251-258.
 8. Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G., Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 1987;328:632-634.
 9. 楊維傑. 鍼灸經緯. 臺北. 樂群出版事業有限公司. 1979;293-295.
 10. NK. Cho, KS. Kim. Study of acupuncture treatment on the sprain. *The J. Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 1995;12(1):76.
 11. J.A. Stamford. Descending control of Pain, *British Journal of Anaesthesia*, 1995;75:217-227.
 12. D. Le Bars, A.H. Dickenson, J.M. Besson, Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat, *Pain* 6, 1979;283-304.
 13. Mene' troy, D., De Pommery, J. and Roudier, F. Propriospinal fibers reaching the lumbar enlargement in the rat. *Neurosci. Lett.* 1985;58:257-261.
 14. Merzack R & Wall P.D. Pain mechanism: a new theory. *Science*, 1965;150:971-979.
 15. Basbaum, A.I. and Fields, H.L. Endogenous pain control systems. *Annual Review of Neuroscience*, 1984;7:309-338.
 16. K. Ren, R. Dubner, Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation, *J. Neurophysiol.*, 1996;76:3025-3037.
 17. R.X. Zhang, R. Wang, J.Y. Chen, J.T. Qiao, Effects of descending inhibitory systems on the c-Fos expression in the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation, *Neuroscience* 1994;58:299-304.
 18. D. Le Bars, A.H. Dickenson, J.M. Besson, Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat, *Pain* 6 1979:283-304.
 19. D. Le Bars, D. Bouhassira, L. Villanueva, Opioids and diffuse noxious inhibitory control (DNIC) in the rat, *Adv. Pain Res. Therapy* 1995;22:517-539.
 20. Z. Bing, L. Villanueva, D. Le Bars. Acupuncture and Diffuse Noxious Inhibitory Controls: Naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons, *Neuroscience*, 1990;37(3):809-818.
 21. S.F. Hobbs, U.T. Oh, M.J. Chandler, Q.-G. Fu, D.C. Bolser, R.D. Foreman, Evidence that C1 and C2 propriospinal neurons mediate the inhibitory effects of viscerosomatic spinal afferent input on primate spinothalamic tract neurons, *J. Neurophysiol.* 1992;67:852-860.
 22. Mene' troy, D., De Pommery, J. and Roudier, F. Propriospinal fibers reaching the lumbar enlargement in the rat. *Neurosci. Lett.* 1985;58:257-261.
 23. Kenneth E. Miller, Vickie D. Douglas, A. Brent Richards, Margaret J. Chandler, and Robert D. Foreman. Propriospinal neurons in the C1-C2 spinal segments project to the L5-S1 segments of the rat spinal cord. *Brain Research Bulletin.* 1998;47(1):43-47.
 24. Heapy C.C. Jamieson A., and Russell N.J.W. Afferent c-fiber and A delta activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 1987;90:164-171.
 25. Dickenson AH and Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neuron in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987;30:349-360.
 26. Dickenson AH and Sullivan AF. Differential effects of excitatory amino acid antagonist on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Res.* 1990; 506:31-39.
 27. Skilling S.R., Smullin D.H., Beitz A.J., and Larson A.A.

- Extracellular amino acid concentration in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J. Neurochem.* 1988;51: 127-132..
28. Kuraishi D., Hirota N., Sato Y., Hanashima N., Takagi H., and Satoh M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. *Neuroscience*, 1989;30:241-250.
 29. Haley J.E., Kickenson A.H., and Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology*, 1992;33:251-258.
 30. Draisci G. and Iadarola M.J. Temporal analysis of increases in c-fos preprodynorphin and pre-proenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Molec. Brain Res*, 1989;6:31-37.
 31. Hunt S.P., Pini A. and Evan G. Induction of c-Fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 1987;328:632-634.
 32. Abbadie C. and Besson J.-M. C-Fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience* 1992;48:985-993.
 33. Lucas JJ, Mellstrom B, Colado MI, and Naranjo JR. Molecular mechanism of pain: serotonin receptor agonists trigger transactivation by c-Fos of the prodynorphin gene in spinal cord neurons. *Neuron*, 1993;10:599-611.
 34. Du J and He L. Alterations of spinal dorsal horn substance P following electroacupuncture analgesia—a study of the formalin test with immunohistochemistry and densitometry. *Acupunct Electrother Res.* 1992;17(1):1-6.
 35. Yun-Kyoung Yim. The effect of Bee Venom Acupuncture into ST36 on Formalin induced Pain Behavior and Neuronal Activity in the Spinal Cord. Graduate School of KyungHee Univ. 2000;1-43.
 36. Watkins, L.R. and Mayer, D.J., Organization of endogenous opiate and non-opiate pain control system. *science.* 1982;216:1185-1192.
 37. Chapman CR, Benedetti C, Colpitts YH, Gerlach R. Naloxone fails to reverse pain thresholds elevated by acupuncture: acupuncture analgesia reconsidered. *Pain.* 1983;16(1):13-31.
 38. Takeshige C., Sato T., Mera T., Hisamitsu T., Fang J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull.* 1992;29(5): 617-634.
 39. Takeshige, C., Sato, T., Mera, T., Hisamitsu, T., Fang, J., Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull.* 1992;29:617-634.
 40. Fields, H.L., Malick, A. and Burstein, R., Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla, *J. Neurophysiol.* 1995;74:1742-1759.