

鍼刺戟에 대한 반응과 비반응군 흰쥐의 특이 유전자 발현 연구

서영찬¹ · 노삼웅¹ · 이기석² · 고은정¹ · 홍무창¹ · 신민규¹ · 민병일² · 배현수^{1,3*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 경희대학교 대학원 동서의학과, 3: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Gene Expression Profile of the Responder vs. the Non-Responder to the Acupuncture Mediated Analgesic Effects

Young Chan Sur¹, Sam Woong Rho¹, Gi Seog Lee², Eun Jung Ko¹,
Moo Chang Hong¹, Min Kyu Shin¹, Byung il Min², Hyun Su Bae^{1,3*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,
2: Department of East-West Medicine, Graduate School, Kyunghee University, 3: Purimed R&D Institute

A pain is the symptom which defends against noxious stimulus about a human body, it is known that if the periphery of perceptive nerve were stimulated by a physical or chemical factors, the stimulation is induced by transmission to pain center in the cerebral cortex according to pain conduction tract. The treatment of pain is to decrease a stimulus that causes a pain or block off a nerve transmitting a stimulus or puts on a way to calm down pain center, but It is for adjustment of a pain to be the most representative in acupuncture among various ways to cure a pain in Oriental medicine. However, the analgesic effect of an individual response to acupuncture stimulation shows marked individual variations, so these days genetic a few approach is attempted. On this the author determined that the responding group was appointed those whose tail flick latency (TFL) responding time delayed the minimum of 30 % comparing with basal reaction time. For those whose TFL time had shorter than 30 % was grouped as a non-responding group. And then the hypothalamus of each group was dissected and RNA was further purified. After synthesizing cDNA using oligo dT primer, products were finally applied to the PCR. The results were as follows ; The ratio of responding group to non-responding group was 6:4. Ach T (acetylcholinesterase T subunit), BF- 1 (Brain factor- 1), DBH (Dopamine β -hydroxylase) and PNM (Phosphotidylethanolamine N-Methyltransferase) were revealed significantly in the responding group. Cathepsin B and Tau were revealed significantly in the non-responding group. The PCR results show that Ach T, BF- 1, DBH and PNM are expressed abundantly in the responding group, where as cathepsin B and tau are abundant in the non-responding group. These results suggest that the analgesic effect on acupuncture stimulation is related to regulation of neurotransmitter as well as neurodegeneration of cerebrum.

Key words : Realtime RT-PCR, Ach T, BF- 1, PNM, DBH, cathepsin, Tau, Acupuncture, Analgesic effect

서 론

痛症은 실제적 혹은 잠재적 조직손상과 관련된 또는 그러한 손상으로 표현되는 불쾌한 감각적 그리고 정서적 경험으로 정의 된다¹⁾. 하지만 痛症은 현대의학에서도 여전히 의문으로 남아 있으며, 실제적인 傷害나 刺戟, 즉 인체에 대한 물리적 손상이 없어도 느낄 수 있는 일종의 감각 (perception)이다. 또한 통증은 생체에 대한 有害刺戟을 防禦할 목적으로 느끼는 症候로, 知覺神經

의 末梢가 物理的 또는 化學적 인자에 의하여 刺戟되면 그 刺戟이 痛覺傳導路를 따라 大腦皮質에 있는 痛覺中樞에 傳導되어 誘發된다고 알려져 있다^{2,5)}. 한의학에서 통증에 대한 認識은 《黃帝內經》에서 이미 형성되어, 痛症의 病機가 氣血運行의 障礙에 있다고 보았다⁶⁾. 痛症의 治療는 痛症의 원인이 되는 刺戟을 감소시키거나, 刺戟을 傳導하는 神經을 遮斷시키거나, 痛覺中樞를 鎮靜시키는 방법을 쓰기도 하지만³⁾, 한의학에서는 통증을 치료하는 여러 가지 방법들 중에서 침을 통한 통증의 조절이 가장 대표적인 것이다. 침치료법은 경락의 기혈을 조절하여 질병을 치료하고 痛症을 抑制하는 방법으로, 痛症抑制에 卓越한 效능이 알려져 있으며 최근에는 多樣한 鍼術方法들이 試圖되고 있는 실정이다^{7,9)}.

* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학
· E-mail : hbae@khu.ac.kr · Tel : 02-961-0323
· 접수 : 2003/02/24 · 수정 : 2003/04/15 · 채택 : 2003/05/20

침자극에 의해 나타나는 진통작용은 opioid peptide에 의한 하행성 통각 조절을 통해 이루어지는 것으로 추측되고 있다¹⁰. 침자극에 대한 실험적 연구 결과를 살펴보면 모든 個體가 鍼刺戟에 유효한 반응을 나타내는 것은 아니며, 電鍼刺戟에 의한 진통의 효과를 관찰하는 실험에서 개체간의 뚜렷한 반응의 차이를 나타내는데, Takeshige 등¹¹은 이들을 반응군과 비반응군으로 구분하였다. 그는 쥐 (rat)에게 施術한 鍼刺戟 이후의 미도피 반사 반응 (tail flick latency; TFL) test에서 반응군과 非反應群의 비율을 약 6:4 정도로 보고하고 있으며, 두 群의 차이는 met-enkephaline의 합성의 차이에 의한 것으로 보았고¹², Han 등¹³⁻¹⁶은 電鍼의 진통효과 실험에 있어서 Cholecystokinin-octapeptide (CCK-8)의 분비량의 차이가 개체간의 반응 차이를 만든다고 보았다. 그러나 복잡하고 유기적인 생물체의 현상을 한두 가지 물질의 합성량 차이로 규정하는 것은 한계가 있으며 이런 기존 실험의 한계를 극복하기 위해 cDNA microarray 방법을 사용하여 동시에 수백 개 혹은 수천 개의 유전자 발현량을 비교하기도 한다. 반응군과 비반응군 시상하부에서의 유전자 발현량을 cDNA microarray를 이용하여 하행성 통각 조절의 주요 대뇌중추인 시상하부¹⁷⁻¹⁹에서 침자극에 대한 개체간 진통효과의 차이의 원인이 되는 다수의 특이 유전자를 확인한 결과 신경전달물질의 조절 및 대뇌신경퇴화와 관련된 유전자가 관여하는 것으로 나타났다. 실험결과 반응군에서 많이 발현되는 유전자로는 Ach T (Acetylcholinesterase T subunit), BF-I (Brain factor-I), DBH (Dopamine beta-hydroxylase)와 PNM (Phosphotydythaolamine N-methyltransferase) 등 외에 다수의 신경계에 직접적 및 간접적으로 작용하는 단백질을 합성하는 유전자가 존재했으며, 비반응군에서 많이 발현된 유전자에는 cathepsin B와 Tau 등이 있었다²⁰. 이러한 실험결과는 單數의 실험군만을 대상으로 한 것이므로 통계적 유의성을 검증하기에는 문제가 있다.

이에 저자는 다수의 실험 동물을 사용하여 통계적으로 유의성을 검증할 수 있는 real-time RT-PCR 기법을 사용하여 침자극에 의한 진통효과와 대뇌전사효소, 신경전달물질합성대개효소 및 신경계 퇴화표식자 유전자들과의 통계적 유의성을 확인하였으며, 이를 바탕으로 침자극에 의한 진통효과의 기전을 유추하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 동물 및 재료

1) 실험동물

체중 200~300g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (대한실험동물, n=14)로서 흰쥐용 固形 사료 (삼양유지, 소동물용)와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간 중 stress 및 환경의 변화를 최소화함으로써 실험 외 요인들이 신경세포의 활성화에 영향을 미치지 않도록 실험동물들을 관리하였으며, 실험은 일반적인 조명과 24±2℃의 온도에서 실시하였다.

2) 전침 자극

전침자극은 stainless still 호침 (직경 0.25mm, 길이 30mm. 동방침구, 한국)으로 인체의 足陽明胃經 족삼리 (ST36)에 상응하는 부위를 骨度分寸法²¹에 준하여 자침하고²² 족삼리 하 5mm 부위를 한 쌍의 침을 사용하여 양극성으로 자침한 후 전침기 (Model PG-6, Ito Co. Japan)를 사용하여 2Hz의 저주파 자극을 0.2-0.3mA의 강도로 15분간 지속시켰다.

2. 실험방법

1) TFL (Tail Flick Latency) test

흰쥐의 꼬리 표면에 가해진 유해성 방사 열자극에 대한 꼬리의 回避 반응시간인 TFL 증가정도를 진통효과의 지표로 삼았다. 실험동물의 TFL test의 기본 반응시간 (basal reaction time; BRT)을 결정하고자 전침자극을 주지 않은 상태에서 자동화된 Tail flick unit (Ugo Basile, Comrio, Italy)을 사용하여 흰쥐의 꼬리 근위 1/3 구간에 적외선 beam으로 방사 열자극을 주고, 흰쥐가 꼬리를 회피하는 순간 꼬리에서 반사된 적외선 energy가 감지되어 에너지가 갑자기 하강하면 자동으로 타이머가 정지, 반응시간을 측정하였다. 이와 같은 test는 1분 간격으로 3회 실시되 격일로 3일 반복하였으며 꼬리의 한 지점에 연속적이고 반복적인 열자극이 주어지는 것을 막기 위하여 자극이 주어진 지점을 표시하고 꼬리의 근위 1/3 부위를 넘지 않는 범위내에서 자극점의 위치를 바꿔 주었다. 과도한 열자극에 의한 조직 손상을 막기 위하여 7초미만의 열자극으로 제한하였다. 총 9회 test의 평균값을 구하여 기본반응시간을 구하였으며 이 과정에서 기본 반응시간이 3.0±0.5초가 되게 적외선 beam의 강도를 조절하였다. 기본 반응시간이 결정된 흰쥐에게 1일간 안정기를 주고 전침자극을 준 후 다시 TFL test를 실시하였다. 전침자극에 의한 진통효과는 침자극 전후 TFL의 변화를 백분율로 환산하여 아래와 같이 조사하였으며²³ 기본 반응시간에서 유의성있게 (p<0.05, Student's t-test) 30% 이상 증가한 군을 반응군 (responder group), 30% 이하로 증가한 군을 비반응군 (non-responder group)으로 분류하였다^{24,25}.

Formula 1. Increasing Rate of TFL

$$\text{Increasing Rate of TFL} = \frac{\text{PEA RT} - \text{BRT}}{\text{BRT}} \times 100\%$$

BRT (basal reaction time): Reaction time of TFL test without electroacupuncture stimulation. PEA RT (post, electroacupuncture reaction time): Reaction time of TFL test after electroacupuncture stimulation.

2) Real-time RT-PCR

(1) Total RNA의 분리

실험동물의 중추신경계에 미치는 영향을 최소화하기 위해 마취제를 사용하지 않는 한편 대뇌에 손상을 주지 않기 위해 척추에 단발성의 강한 손상을 주어 희생시킨 뒤 20mg의 시상하부를 채취하여 200 μl의 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)에 담아 -80℃에서 보존하였다가 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다.

시상하부 조직은 pellet pestle을 이용하여 균질화 하였다. 균

질화된 용액에 300 μ l의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상청액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 μ l의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 500ul의 75% ethanol로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 7500 \times g로 5분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 건조하여 250 μ l의 DEPC (diethylpyrocabonate) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA)를 사용하여 정량 하였다.

(2) cDNA의 합성

cDNA의 합성 (Reverse Transcription)은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다.

2 μ g의 total RNA에 1.1 μ l의 10 \times DNase I Reaction buffer, 1 μ l의 1 Unit/ μ l DNase I (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μ l이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 μ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 반응을 하였다. 10 μ l의 반응액에 1 μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 10mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1M Dithiothreitol, 1 μ l의 200 U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l의 40 U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA), 5.5 μ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37 $^{\circ}$ C에서 60 분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 7 2 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화 하였다.

(3) cDNA의 real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 real-time PCR을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech co., Daejun, Korea), 8.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, UK)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 62 $^{\circ}$ C 45초를 40cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), BF- I, DBH, PNM, Ach T, Cathepsin B, Tau 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의

amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve을 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60~95 $^{\circ}$ C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하고 peak가 하나인지를 확인하는 한편 2% agarose gel에서 band의 size를 확인함으로써 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였다.

Table 1. S equences of primer Used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Amplicon Size (bp)
GAPDH	sense: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'	236
	antisense: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	
BF- I	sense: 5'-CCG GGC AAG GGC AAC TAC TG-3'	164
	antisense: 5'-GCG CGG TCC ATG AAG GTG A-3'	
DBH	sense: 5'-CTC CAC ACG CAC CTG ACC-3'	238
	antisense: 5'-TGA CGC ACA TCT CCT CCA A-3'	
PNM	sense: 5'-ACT CGT GTT TGT GCT CTC C-3'	307
	antisense: 5'-GCC CTG TCA GCT CCT ITT G-3'	
Ach T	sense: 5'-ACG CCG GAC GCT CTC ATC AAT A-3'	198
	antisense: 5'-CTC GGC CGC CAG GTC ACT C-3'	
Tau	sense: 5'-CCA CAG CCT ACA CTA CTA GC-3'	305
	antisense: 5'-CAC AGA CAG GAA GCT AAG CT-3'	
Cathepsin B	sense: 5'-TGA CGG GAG GCC ATG CCA TC-3'	197
	antisense: 5'-ACT TTA GAA TCT TCC CCA GT-3'	

(4) 전기영동

2% agarose gel에서 PCR 반응액 5 μ l를 loading하고 1 \times TAE buffer (40mM Tris, 20mM acetate pH 8.1, 2mM EDTA)에서 100 volt, 30분 동안 전기영동한 후 Ethidium Bromide (Bio-Rad, California, USA)로 염색하여 GEL-DOC (photodoc system, Bio-Rad, USA)에서 확인하였다.

3) Data의 처리

PCR data는 GeneAmp 5700 software (PE Biosystems, Warrington, UK)을 이용하여 얻었고 mean \pm S.D.로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 Student t-test로 처리하였으며, 선형회귀분석 및 plotting은 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc., USA)를 이용하였다.

성 적

1. 반응군과 비반응군의 분류

14마리의 흰쥐에서 기본반응시간을 결정하고 전침자극을 준 후 TFL time의 지연정도를 Formula 1과 같이 평가하여 30% 이상 지연된 흰쥐는 반응군으로, 30% 미만 지연된 흰쥐는 비반응군으로 분류한 결과는 Table 2와 같다. 반응군은 9마리, 비반응군은 5마리로 분류되어 비율은 대략 6:4 정도였다. 이렇게 분류된 반응군과 비반응군에서의 TFL time 지연 정도를 비교한 결과, 반응군에서 비반응군에 비하여 p<0.001로 유의성있게 TFL time이 지연된 것으로 나타났다 (Fig. 1).

Table 2. Classification of Responder and non-Responder according to increasing rate of TFL time.

(a) Responder Group				(b) non-Responder Group			
	BRT (sec)	PEA RT (sec)	Increasing rate (%)		BRT (sec)	PEA RT (sec)	Increasing rate (%)
1	3.0	5.8	93.3%	1	3.0	3.5	16.7%
2	3.1	5.0	61.3%	2	2.9	3.4	17.2%
3	2.7	5.3	96.3%	3	2.8	3.0	7.1%
4	2.6	3.6	38.5%	4	2.7	3.1	14.8%
5	3.1	5.7	83.9%	5	2.9	3.0	3.4%
6	3.0	5.6	86.7%	Mean	2.9	3.2	11.9%
7	3.0	5.3	76.7%				
8	3.1	5.1	64.5%				
9	3.0	4.5	50.0%				
Mean	3.0	5.1	72.3%				

The responder group is appointed to those whose TFL time increased at least 30% compared to the basal reaction time. For those whose TFL time increased less than 30% are grouped as a non-responder group.

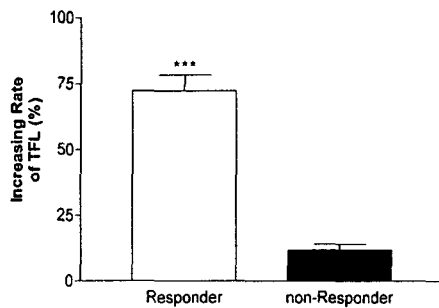


Fig. 1. Increasing rate of TFL. Responder for those whose responding time increase minimum of 30% comparing to the basal reaction time, and non-responder for those that had less than 30%. *** : p(0.001)

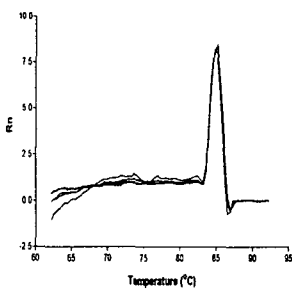
2. 특정 유전자 발현량 평가

반응군과 비반응군 각각의 hypothalamus에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 특정 유전자의 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 Internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 2와 같다.

A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard Curve of GAPDH

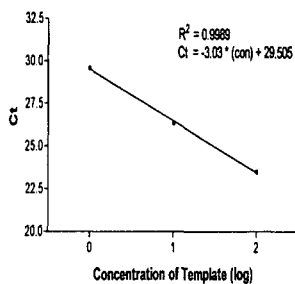


Fig. 2. Dissociation and Standard curve of GAPDH as internal control A. After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B. Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9989로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. 작성된 standard curve를 기준으로 하여 평가한 각 sample의 상대적 양은 Table 3과 같다.

Table 3. Relative expression level of GAPDH

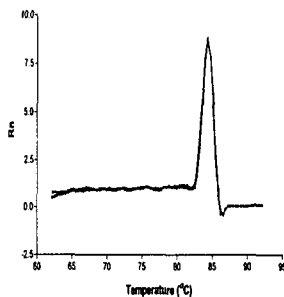
Responder	Expression level of GAPDH	Non-Responder	Expression level of GAPDH
R1	85.05 ± 0.87	N1	190.23 ± 17.13
R2	350.13 ± 23.14	N2	250.16 ± 13.14
R3	203.20 ± 19.98	N3	277.78 ± 11.58
R4	177.47 ± 9.58	N4	326.51 ± 17.25
R5	80.89 ± 2.47	N5	218.76 ± 15.03
R6	226.51 ± 9.54		
R7	143.00 ± 8.10		
R8	118.48 ± 15.03		
R9	274.24 ± 20.91		

The relative expression levels of GAPDH were obtained according to standard curve.

2) Ach T

Ach T 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 3과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9998로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of Ach T



B. Standard Curve of Ach T

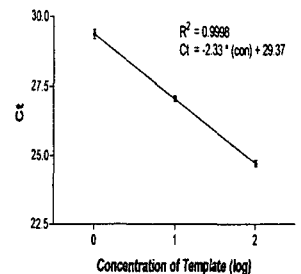


Fig. 3. Dissociation and Standard curve of Ach T

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Ach T 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). 반응군에서의 Ach T mRNA의 발현량은 비반응군에 비하여 1.86배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.01).

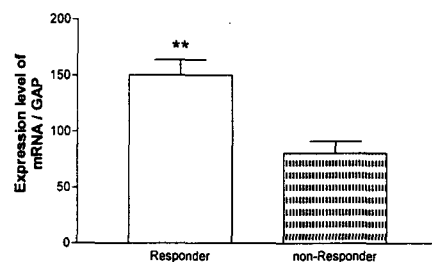


Fig. 4. Expression level of Ach T Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. ** : p(0.01 vs non-Responder)

질화된 용액에 300 μ l의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상청액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 μ l의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 500ul의 75% ethanol로 세척한 후 4°C에서 7500 \times g로 5분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 건조하여 250 μ l의 DEPC (diethylpyrocabonate) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA)를 사용하여 정량 하였다.

(2) cDNA의 합성

cDNA의 합성 (Reverse Transcription)은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다.

2 μ g의 total RNA에 1.1 μ l의 10 \times DNase I Reaction buffer, 1 μ l의 1 Unit/ μ l DNase I (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μ l이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 μ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 반응을 하였다. 10 μ l의 반응액에 1 μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 10mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1M Dithiothreitol, 1 μ l의 200 U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l의 40 U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Rokville, USA), 5.5 μ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37°C에서 60 분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 enzyme를 불활성화 하였다.

(3) cDNA의 real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 real-time PCR을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech co., Daejun, Korea), 8.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, UK)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95°C 15초, 62°C 45초를 40cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), BF- I, DBH, PNM, Ach T, Cathepsin B, Tau 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의

amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve을 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60~95°C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하고 peak가 하나인지를 확인하는 한편 2% agarose gel에서 band의 size를 확인함으로써 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였다.

Table 1. S equences of primer Used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Amplicon Size (bp)
GAPDH	sense: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'	236
	antisense: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	
BF- I	sense: 5'-CCG GGC AAG GGC AAC TAC TG-3'	164
	antisense: 5'-GCG CGG TCC ATG AAG GTG A-3'	
DBH	sense: 5'-CTC CAC ACG CAC CTG ACC-3'	238
	antisense: 5'-TGA CGC ACA TCT CCT CCA A-3'	
PNM	sense: 5'-ACT CGT GTT TGT GCT CTC C-3'	307
	antisense: 5'-GCC CTG TCA GCT CCT TTT G-3'	
Ach T	sense: 5'-ACG CCG GAC GCT CTC ATC AAT A-3'	198
	antisense: 5'-CTC GGC CGC CAG GTC ACT C-3'	
Tau	sense: 5'-CCA CAG CCT ACA CTA CTA GC-3'	305
	antisense: 5'-CAC AGA CAG GAA GCT AAG CT-3'	
Cathepsin B	sense: 5'-TGA CGG GAG GCC ATG CCA TC-3'	197
	antisense: 5'-ACT TTA GAA TCT TCC CCA GT-3'	

(4) 전기영동

2% agarose gel에서 PCR 반응액 5 μ l를 loading하고 1 \times TAE buffer (40mM Tris, 20mM acetate pH 8.1, 2mM EDTA)에서 100 volt, 30분 동안 전기영동한 후 Ethidium Bromide (Bio-Rad, California, USA)로 염색하여 GEL-DOC (photodoc system, Bio-Rad, USA)에서 확인하였다.

3) Data의 처리

PCR data는 GeneAmp 5700 software (PE Biosystems, Warrington, UK)을 이용하여 얻었고 mean \pm S.D.로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 Student t-test로 처리하였으며, 선형회귀분석 및 plotting은 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc., USA)를 이용하였다.

성 적

1. 반응군과 비반응군의 분류

14마리의 흰쥐에서 기본반응시간을 결정하고 전침자극을 준 후 TFL time의 지연정도를 Formula 1과 같이 평가하여 30% 이상 지연된 흰쥐는 반응군으로, 30% 미만 지연된 흰쥐는 비반응군으로 분류한 결과는 Table 2와 같다. 반응군은 9마리, 비반응군은 5마리로 분류되어 비율은 대략 6:4 정도였다. 이렇게 분류된 반응군과 비반응군에서의 TFL time 지연 정도를 비교한 결과, 반응군에서 비반응군에 비하여 p<0.001로 유의성있게 TFL time이 지연된 것으로 나타났다 (Fig. 1).

Table 2. Classification of Responder and non-Responder according to increasing rate of TFL time.

(a) Responder Group				(b) non-Responder Group			
	BRT (sec)	PEA RT (sec)	Increasing rate (%)		BRT (sec)	PEA RT (sec)	Increasing rate (%)
1	3.0	5.8	93.3%	1	3.0	3.5	16.7%
2	3.1	5.0	61.3%	2	2.9	3.4	17.2%
3	2.7	5.3	96.3%	3	2.8	3.0	7.1%
4	2.6	3.6	38.5%	4	2.7	3.1	14.8%
5	3.1	5.7	83.9%	5	2.9	3.0	3.4%
6	3.0	5.6	86.7%				
7	3.0	5.3	76.7%				
8	3.1	5.1	64.5%				
9	3.0	4.5	50.0%				
Mean	3.0	5.1	72.3%	Mean	2.9	3.2	11.9%

The responder group is appointed to those whose TFL time increased at least 30% compared to the basal reaction time. For those whose TFL time increased less than 30% are grouped as a non-responder group.

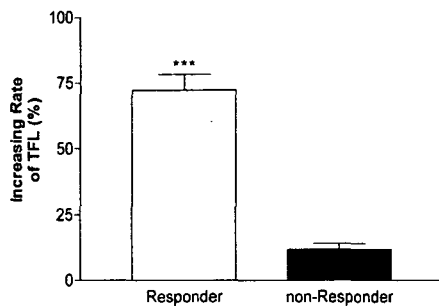


Fig. 1. Increasing rate of TFL. Responder for those whose responding time increase minimum of 30% comparing to the basal reaction time, and non-responder for those that had less than 30%. *** : p<0.001

2. 특정 유전자 발현량 평가

반응군과 비반응군 각각의 hypothalamus에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 특정 유전자의 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 Internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 2와 같다.

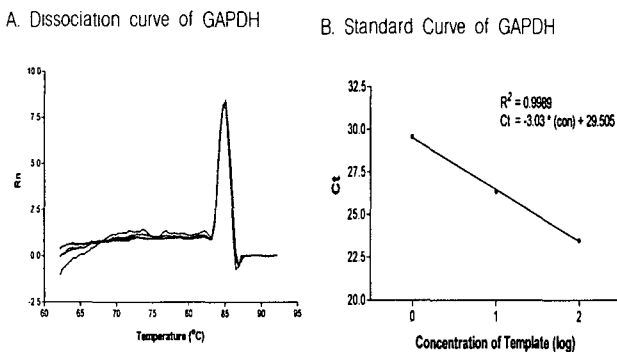


Fig. 2. Dissociation and Standard curve of GAPDH as internal control A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석 결과 R2는 0.9989로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. 작성된 standard curve를 기준으로 하여 평가한 각 sample의 상대적 양은 Table 3과 같다.

Table 3. Relative expression level of GAPDH

Responder	Expression level of GAPDH	Non-Responder	Expression level of GAPDH
R1	85.05 ± 0.87	N1	190.23 ± 17.13
R2	350.13 ± 23.14	N2	250.16 ± 13.14
R3	203.20 ± 19.98	N3	277.78 ± 11.58
R4	177.47 ± 9.58	N4	326.51 ± 17.25
R5	80.89 ± 2.47	N5	218.76 ± 15.03
R6	226.51 ± 9.54		
R7	143.00 ± 8.10		
R8	118.48 ± 15.03		
R9	274.24 ± 20.91		

The relative expression levels of GAPDH were obtained according to standard curve.

2) Ach T

Ach T 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 3과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9998로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of Ach T

B. Standard Curve of Ach T

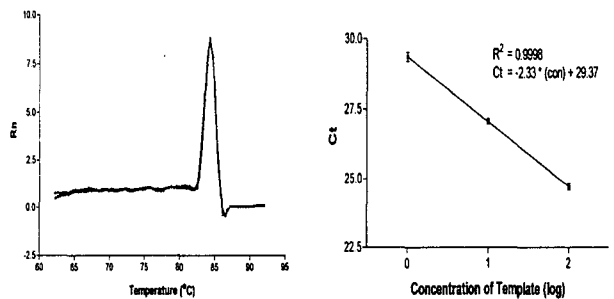


Fig. 3. Dissociation and Standard curve of Ach T

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Ach T 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). 반응군에서의 Ach T mRNA의 발현량은 비반응군에 비하여 1.86배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.01).

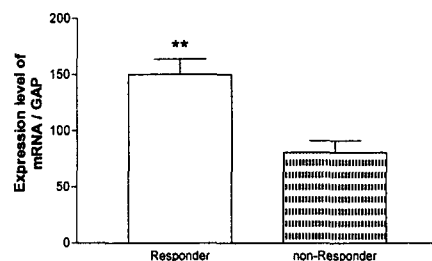


Fig. 4. Expression level of Ach T Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. ** : p<0.01 vs non-Responder

3) BF- I

BF- I 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve 와 standard curve는 Fig. 5와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9966으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

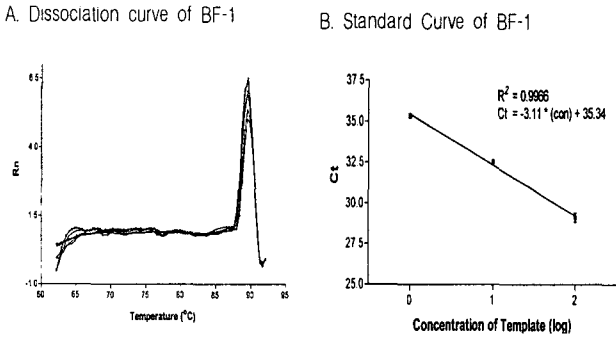


Fig. 5. Dissociation and Standard curve of BF- I

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 BF- I 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 6). 반응군에서의 BF- I mRNA의 발현량은 비반응군에 비하여 2.46배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.001).

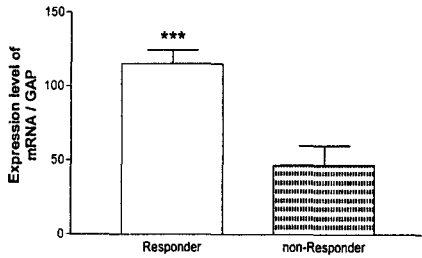


Fig. 6. Expression level of BF-I Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. *** : p<0.001 vs non-Responder

4) DBH

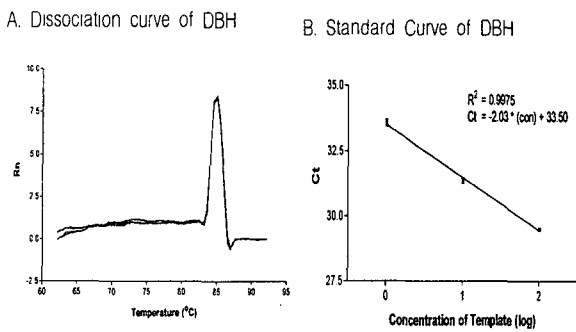


Fig. 7. Dissociation and Standard curve of DBH

DBH 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 7과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을

보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9975로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 DBH 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 8). 반응군에서의 DBH mRNA의 발현량은 비반응군에 비하여 1.58배 많이 발현된 것으로 나타났다.

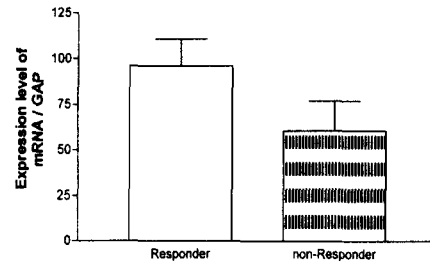


Fig. 8. Expression level of DBH Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

5) PNM

PNM 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve 와 standard curve는 Fig. 9와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9955으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

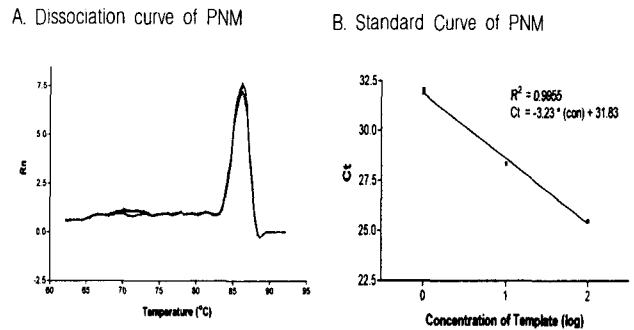


Fig. 9. Dissociation and Standard curve of PNM

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 PNM 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 10). 반응군에서의 PNM mRNA의 발현량은 비반응군에 비하여 1.56배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.05).

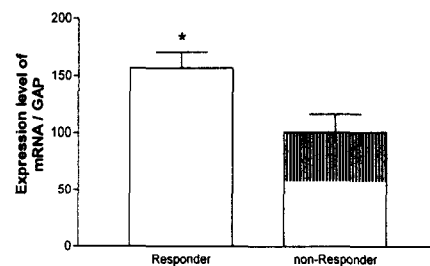


Fig. 10. Expression level of PNM Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. * : p<0.05 vs non-Responder

6) Cathepsin B

Cathepsin B 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 11과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9940으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of Cathepsin B B. Standard Curve of Cathepsin B

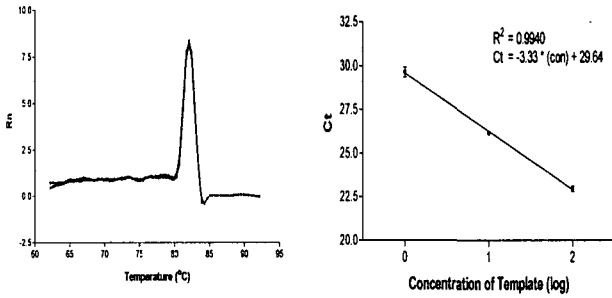


Fig. 11. Dissociation and Standard curve of Cathepsin B

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Cathepsin B 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 12). 비반응군에서의 Cathepsin B mRNA의 발현량은 반응군에 비하여 1.52배 많이 발현한 것으로 나타났다.

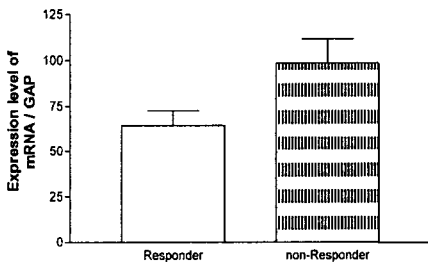


Fig. 12. Expression level of Cathepsin B Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

7) Tau

Tau 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 13과 같다.

A. Dissociation curve of Tau B. Standard Curve of Tau

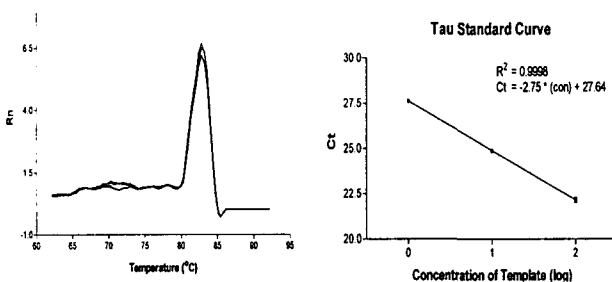


Fig. 13. Dissociation and Standard curve of cathepsin B

Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀 분석결과 R2는 0.9998로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Cathepsin B 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 14). 비반응군에서의 Cathepsin B mRNA의 발현량은 반응군에 비하여 3.34배 유의성 있게 많이 발현한 것으로 나타났다 (p<0.05).

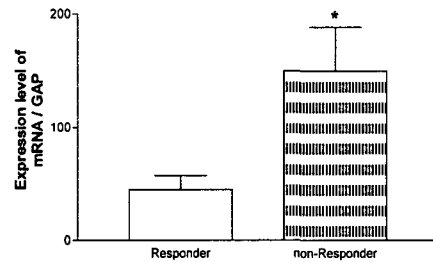


Fig. 14. Expression level of Tau Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. * : p<0.05 vs Responder

고찰

痛症은 실질적인 또는 잠재적인 조직손상과 관련된 감각적이고 정서적인 불유쾌한 경험을 말하는데 이는 신체에 발생한 이상 상태를 정상상태로 회복시키고자 하는 생체 방어기전의 일환으로 경고의 뜻을 갖고 있다. 한의학에서 痛症에 대한 인식과 치료는 그 기원이 길고 경험도 매우 풍부하며 시대별로 변천을 거듭하여 그 자체의 우수성과 특색을 나타내고 있다²⁶⁾. 한의학에서는 痛症의 원인을 寒·熱·七情九氣·飲食所傷·蟲·痰飲·血虛·瘀血 등으로 보고 있는데, 痛症이란 것은 寒氣로 인한 것이 많으며, 寒이 있으면 痛症이 나타난다고 하여 寒이 痛症을 일으키는 가장 많은 원인이라 하였고, 《內經·舉痛論》에서는 15條의 痛症 중 14條가 寒氣와 관련되어 표현되어 있다. 한편, 寒은 形을 상하게 하고, 熱은 氣를 상하게 하며, 氣가 손상되면 痛症을 일으킨다고 하였고²⁷⁾, 일반적으로 痛症은 寒氣로 인한 것이 많다고 하였으며²⁷⁾, 그 病理的 機轉은 통하지 않으면 痛症이 나타난다고 하여 經脈 中의 氣血運行障礙가 痛症發生의 원인이 된다고 하였다.

痛症의 분류는 각각의 臟器에 따라 특이한 영역에 반응을 하게 되며, 부위·시간·원인에 따라 痛症이 다르게 표현되며, 痛症의 성질은 느끼는 부위와 감각에 따라 구별된다²⁸⁾. 痛症의 병리적인 기전을 보면, 크게 不通則痛과 不營則痛로 볼 수 있는데, 不通則痛은 實痛에 대한 병리적인 기전으로 《內經·舉痛論》에 언급된 15條의 痛症 중 대부분이 榮衛滯澁, 筋脈絀急, 熱閉不通, 氣血鬱逆, 瘀血內阻 등의 병리변화로 표현되어 不通이라는 개념을 내포하고 있다. 이 후 李東垣은 《內經》의 舉痛論에 기초하여 痛則不通이라는 병리학설을 개진하였고 나아가 王好古²⁹⁾는 不通則痛이라는 이론을 전개하였다. 그 후 역대의 제가들은 不通則痛이라는 병리적인 상황을 痛症으로 인식하였고, 더 나아가 氣滯血瘀나 血瘀氣滯 등으로 氣의 운행이 방해되어 痛症이

생긴다고 하였다. 또한 不營則痛이라는 것은 邪氣로 인하여 氣가 손상되거나 혹은 臟腑의 氣는 저하되고, 陰陽氣血의 虛損, 人體經絡의 營養不足으로 痛症을 유발하는 것으로 虛痛의 병리변화이다. 痛症의 병리는 이처럼 不營과 不通으로 나뉘어지므로 그 治法도 補法과 通法으로 나뉘어진다. 通法은 寒·瘀血·痰飲·七情九氣 등으로 인해 생긴 氣血의 鬱滯를 氣血의 運行을 暢達시키는 방법을 써서 氣血의 調和를 이루는 방법이며, 補法은 邪氣로 인하여 氣가 손상되거나 혹은 臟腑의 氣는 저하되고, 陰陽氣血의 虛損, 人體經絡의 營養不足 등으로 유발된 痛症을 그 虛損된 것을 補益하는 방법으로 치료하는 것을 말한다. 일반적으로 痛症에 대한 治法은 그 병인을 제거하고 증상완화를 꾀하고 氣血을 소통시키며 陰陽의 調和를 이루어 臟腑의 기능을 회복시키는 것을 그 大綱으로 한다²⁸⁾. 이러한 痛症에 대한 치료에 있어서 다빈도로 선택되어 온 것이 鍼이라 할 수 있는데 鍼의 진통작용은 한의학에서는 이미 오래 전부터 잘 알려져 온 것으로 임상에서 나타나는 제반 痛症에 모두 鍼을 적용할 수 있다.

鍼은 經脈을 통하게 하고 血氣를 調節하며²⁷⁾, 鍼을 사용하여 氣를 調節한다고 하였으며³⁰⁾, 무릇 刺鍼의 道는 반드시 먼저 神을 다스린다 하였다²⁷⁾. 침자극이 鎮痛에 미치는 영향에 관한 실험연구로는 水鍼刺戟³¹⁾, 電鍼刺戟³²⁾, 刺絡療法³³⁾, 豪鍼刺戟³⁴⁾ 및 Laser 鍼刺戟³⁵⁾을 시행한 논문 등이 있으며, 이들 연구 결과는 鍼刺戟이 鎮痛에 유효함을 입증하였다. 이와 같이 鍼刺戟에 의한 진통효과는 오랜 역사를 갖고 현재에도 효과적인 임상결과를 나타내고 있으나 작용기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 한의학에서 鎮痛을 목적으로 침을 이용하여 왔음은 역사적으로 상당히 오래되었지만 이의 기전을 밝히려는 과학적인 연구는 비교적 최근부터였다. 침이 진통효과가 있음은 사람과 실험동물을 통하여 잘 알려지고 있으며 그 연구방법도 좀 더 개선되어 전기자극을 가하는 電鍼이 많이 이용되고 있으나 아직 확실한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 최근 10여년간의 침자극에 의한 진통효과를 밝히려는 일련의 연구보고들을 살펴보면 크게 내분비계에 의한 진통작용과 신경섬유를 통한 진통억제 작용으로 나누어 볼 수 있다. 내분비계에 의한 진통작용은 침자극을 가했을 때 동물이나 사람의 중추신경계에서 모종(某種)의 화학물질이 분비되어 opiate receptor와 결합하여 진통작용을 나타낸다는 것이다. 대표적인 화학물질로는 morphine이 있는데 이것은 specific opiate antagonist인 naloxane에 의해 진통이 억제됨으로써 알려지게 되었다³⁶⁻⁴¹⁾. 다른 기전으로는 신경해부학적으로 periaqueductal gray (PAG)로부터 nucleus raphe magnus (NRM)로 신경로가 존재하고⁴²⁾ 또한 NRM으로부터 척수로의 raphe-spinal 하행성신경로가 척수의 dorsolateral funiculus에 존재하는데⁴³⁾ 이들 부위 자극시 척수후각에 존재하는 통각전달세포의 활성이 억제된다. 즉, 이들 부위가 활성화되면 하행성 신경로를 통하여 척수의 후각에서 말초로부터 척수로 들어오는 통각정보를 억제시킴으로써 중추로의 통각전달을 차단시키는 descending pain inhibitory system이 존재하는 것이다. 또한 척수 후각의 substantia gelatinosa 부위에도 endorphin 또는 enkephalin을 함유하는 작은 중간신경들과 opiate receptor가 존

재하며⁴⁰⁾ 이 부위에 소량의 morphine을 직접 투여하였을 경우 통각전달세포의 활성이 억제됨이 알려졌는데^{44,45)}, 이는 이들 중간신경이 활성화되었을 경우도 중추로의 통각 전달이 차단될 가능성을 보이는 것이다. 또한, DNIC (diffuse noxious bitory control) system은 침자극이 중추신경계의 여러 차원에서 痛症을 제어하는 시스템을 활성화시킨다고 설명한다. 이 외에 뇌간의 여러 핵에 있는 여러 부위로부터 구심성 뉴우런이 집중관련 된다는 주장도 있다⁴⁶⁾. 최종구심로에 도달한 침자극은 이 곳의 뉴런으로부터 opioid peptide를 분비하게 하여, 이 물질에 의하여 중추신경계에 존재하는 痛症조절계를 활성화시킴으로서 말초에서 생성된 통각신호를 중추의 입구에서 억제한다는 이론으로, 흔히 하행성 억제설 (descending inhibitory theory)이라고 한다^{47,48)}.

이상의 사실을 종합해보면 어떠한 기전이든 endogenous opiate system이 활성화되어 morphine과 유사한 물질이 유리되면 진통효과를 나타낼 것으로 추측되는데 電鍼의 진통효과가 naloxone으로 억제됨은 電鍼의 진통작용이 endogenous opiate system과 연관될 가능성을 나타낸다. 따라서, 침술의 진통효과가 사람과 동물실험에서 specific opiate antagonist인 naloxone에 의해 소실됨은⁴⁹⁻⁵¹⁾ 침술이 중추신경계에 존재하는 morphine과 유사한 물질을 매개로 그 작용을 나타낼 것으로 추측되는 바 침술의 진통작용기전과 morphine의 진통작용기전은 상호 연관성을 나타낼 것으로 보인다. 하지만 모든 개체가 鍼刺戟에 유효한 반응을 나타내는 것은 아니며, 電鍼刺戟에 의한 鎮痛의 효과를 관찰하는 實驗에서 個體間的 뚜렷한 반응의 차이를 나타내는데, Takeshige 등⁵²⁾은 met-enkephaline 합성량의 차이로 보았고, Han 등¹³⁻¹⁵⁾은 Cholecystokinin-octapeptide (CCK-8)의 분비량의 차이에 의한 것이라 보고하였다. 사람에게 있어서도 침자극에 대해 모두 동일한 반응을 나타내는 것은 아닌데, 침의 진통효과가 잘 나타나는 사람이 있는가 하면 효과가 적거나 나타나지 않는 경우도 있다. 자침을 하는 부위에 따라 동일한 刺戟이라 하여도 각기 다른 효과가 발생한다는 것은 경험적으로 입증되고 있는 사실이다. 또한 침의 굵기와 硬度, 刺鍼數量에 따라서도 진통효과의 차이가 나타날 수 있으며, 遠位取穴과 近位取穴에 따른 침자방법에 의해서도 차이가 나타난다. 가장 중요한 것은 환자가 지니고 있는 당시에 反應體勢에 의거하여 진통효과의 차이가 나타난다고 볼 수 있는데, 反應體勢란 침자극에 대응하는 생체의 신경성 調整機構를 말한다⁵²⁾. 이 외에도 침자극에 대한 생체의 반응에는 中樞性의 문제도 있다. McDermid 등⁵³⁾은 섬유근통 환자들과 류머티스성 관절염 환자들 및 정상인을 대상으로 동통민감성을 비교한 결과 만성 동통환자들은 동통감각의 물두 때문에 동통역치와 인내력이 부족함을 밝혔다. 또한 만성병이나 오래된 질환을 지니고 있는 경우 체내의 정기가 저하되어 침의 진통효과가 정상인에 비해 떨어질 수가 있는데 실험적으로 보아 만성 요통을 앓고 있는 환자의 경우 정상인보다 진통을 나타내는 물질인 β -endorphin의 농도가 저하되어 있으며 침자극 후에는 β -endorphin의 농도가 증가하는 것으로 보아⁵⁴⁾ 久病을 앓고 있는 사람의 경우는 정상인에 대해 진통효과가 더 뚜렷하게 나타난다고 볼 수 있다. 하지만 만성 통증환자에게 있어서 동통감각에 대

한 경험이 많기 때문에 동통역치가 높고, 동통자극을 고통스러운 것으로 지각할 가능성이 적으리라는 예측도 가능하다는 상반된 결과도 나오고 있다⁵⁵). 이는 오래된 질환을 앓고 있는 환자의 경우 침에 의한 진통효과가 新病을 앓고 있는 사람들에 비해 떨어지는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 성별에 따라서도 통증을 느끼는 역치 수준은 달라지는데 통증에 대한 민감도는 남성보다 여성이 높은 것으로 알려지고 있다⁵⁶). Feine 등⁵⁷)의 연구에서는 유해한 열자극에 대해 지각 역치가 성별간에 차이가 있다고 하였는데 그 이유는 여성이 통증을 표현하는 것이 남성에 비하여 쉽게 허용되는 사회화적인 요소 등과 생리적이거나 자율신경계의 차이에서 올 수도 있다고 추정하였다. 연령에 있어서도 진통효과는 차이를 나타내는데⁵⁸), 나이가 많은 경우 氣가 衰盡해져서 침의 調氣作用이 저하되게 되고, 나이가 젊은 경우 氣가 充實하여 진통작용이 잘 이루어진다고 볼 수 있다. 다시 말하면 노인의 경우 진통작용을 주관하고 있는 물질들의 고갈과 대반응의 저하, 자율신경계 조절의 기능쇠퇴, 노화세포들의 축적 등으로 인해 침자극에 의한 효과가 감소하는 것이며 나이가 어리거나 젊은 사람의 경우 그 반대로 진통작용을 잘 나타낸다고 할 수 있다. 經脈의 氣血多少나 春夏秋冬, 病所, 寒熱虛實에 따라 병이 존재하는 깊이가 달라지게 되는데 이것에 맞추어 자침의 깊이나 補瀉를 조절하여야 하는데⁵⁹) 이것을 지키지 못하면 적절한 진통작용을 나타낼 수 없게 된다. 이 밖의 요인으로 외과적 수술처치, 통증 조절 약물의 구강 투여나 주사제 투입, 항우울제 · 항경련제 · 신경이완제 · 항히스타민 제제의 복용, 종양환자의 항암요법치료 등의 경력이 있는 사람 등에게서도 진통작용이 정상인들에 비해 낮게 발현되었다⁶⁰). 이러한 여러 가지 원인들에 의해 침의 진통작용은 차이가 나타나게 되며, 근래에 와서는 유전자적인 접근을 시도하여 침의 진통작용에 관여하는 인자가 있음을 밝혀내었다. 이러한 유전자적인 접근은 주로 하나의 물질에 대해서만 기전과 작용을 연구가 대부분이었다. 하지만 단일 물질에 대한 실험 결과로는 침자극에 의한 진통기전을 밝히기에는 한계가 있으므로 수백개 혹은 수천개의 유전자를 대상으로 실험할 수 있는 microarray 법이 시도되기도 하였다. cDNA microarray를 이용하여 하행성 통각 조절의 주요 대뇌중추인 시상하부¹⁷⁻¹⁹)에서 침자극에 대한 개체간 진통효과의 차이의 원인이 되는 다수의 특이 유전자를 확인한 결과 신경전달물질의 조절 및 대뇌신경퇴화와 관련된 유전자가 관여하는 것으로 나타났다. cDNA microarray 결과 반응군에서 많이 발현되는 유전자로는 신경돌기 성장 및 신경접합 형성을 증강시키는 Ach T, transcription factor로서 대뇌피질의 progenitor cell의 증식을 매개하는 BF- I 과 신경전달물질의 합성을 매개하는 효소로서 DBH와 PNM 등 외에 다수의 신경계에 직접적 및 간접적으로 작용하는 단백질을 합성하는 유전자가 있었다. 비반응군에서 많이 발현된 유전자에는 신경계 퇴화의 표식자로 볼 수 있는 cathepsin B와 Tau 등이 있었다²⁰). cDNA microarray 기법은 單數의 실험동물을 대상으로 하기에 통계적 유의성을 검증하기에 한계가 있으며 이를 극복하기 위해 다수의 실험군을 대상으로 하는 real-time RT-PCR 기법을 사용하여 통계적 유의성을 검증해 보았다. 본 실험에서는 먼저 14마리의 흰 쥐들에게 기본반

응시간을 결정하고 전침자극을 준 후 TFL time의 지연정도를 30% 이상 지연된 흰쥐는 반응군으로, 30% 미만 지연된 흰쥐는 비반응군으로 분류한 결과, 반응군은 9마리, 비반응군은 5마리로 분류되어 비율은 대략 6:4 정도였는데 이는 Takeshige의 실험결과와 일치하는 것이다. 이렇게 분류된 반응군과 비반응군에서의 TFL time 지연 정도를 비교한 결과, 반응군에서 비반응군에 비하여 유의성있게 TFL time이 지연된 것으로 나타났다. 각 실험동물들의 시상하부를 취하여 RNA를 추출한 후 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 만들었으며 이를 다시 real-time RT-PCR을 통하여 각 유전자들의 발현량을 조사하였다. 반응군에서는 Ach T, BF- I, DBH, PNM의 발현량이 유의성 있게 나타났으며, 비반응군에서는 cathepsin B와 Tau가 유의성 있게 발현되었다. 반응군에서 많이 나타나는 유전자 중 Ach T은 신경돌기 성장 및 신경접합 형성을 증강시키는 작용을 지니므로써 직접적으로 신경계에 작용을 미치고 있으며, brain factor- I 은 대뇌피질의 전구세포 증식에 필수적인 전사인자이며, DBH와 PNM은 adrenergic neuron에서 신경전달물질인 catecholamine의 합성을 매개하는 효소이다. 비반응군에서 많이 발현된 유전자 중 cathepsin B는 종양의 전이에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 노화된 실험동물에서 3배 이상 증가되는 단백질이며, tau protein은 수용성으로 존재하는 정상적인 형태의 경우 문제가 없으나 비수용성인 hyperphosphorylated isoforms이 병변의 원인이 됨으로써 알츠하이머병 등 신경계의 퇴행성 질환을 유발하게 되는데, 두 가지 모두 신경계의 퇴화를 반영하고 있는 것으로 사료된다²⁰).

따라서 이상의 결과로 보아 전침자극을 통한 진통효과는 신경전달물질의 조절뿐만 아니라 대뇌의 신경퇴화와도 관련이 있는 것으로 사료된다.

결 론

체중 200~300 g의 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐 14마리에 기본반응시간을 결정하고 전침자극을 준 후 TFL time의 지연정도를 30% 이상 지연된 흰쥐는 반응군으로, 30% 미만 지연된 흰쥐는 비반응군으로 분류한 후 반응군과 비반응군 각각의 hypothalamus에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 특정 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

반응군과 비반응군이 9마리와 5마리로 6:4의 비율을 보였다. 반응군에서는 Ach T, BF- I, DBH, PNM이 유의성있게 다량 발현되었다. 비반응군에서는 Cathepsin B, Tau 유전자가 유의성있게 다량 발현되었다.

이상의 결과로 보아 전침자극을 통한 진통효과는 신경전달물질의 조절뿐만 아니라 대뇌의 신경퇴화와도 관련이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의한 것이다. (HMP-00-B-21300-0007)

참고문헌

1. 김지훈, 이종화, 이응경, 이지연, 침의 과학적 접근과 임상, p.328, 대한추나학회출판사, 서울, 2002.
2. 박래준 譯, 연부조직의 동통과 장애, pp.37-47, 대학서림, 서울, 1994.
3. 姜斗熙, 生理學, pp.69, 80, 87, 493, 成咬社, 서울, 1979.
4. 金英載, 痛症, pp.1-2, 壽文社, 서울, 1982.
5. 金哲, 痛症의 生理, p.27, 壽文社, 서울, 1982.
6. 賀普仁, 鍼灸治痛, pp.1-26, 科學技術文獻出版社, 北京, 1987.
7. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室, 鍼灸學(下), pp.489-90, 集文堂, 서울, 1988.
8. 의학교육연구원, 가정의학, p.289, 서울대학교 출판부, 서울, 1990.
9. 崔容泰, 李秀鎬, 精解鍼灸學, pp.166-76, 192-6, 381, 杏林出版社, 서울, 1974.
10. Ulett, G. A., Han, J., Han, S. Traditional and evidence-based acupuncture: history, mechanisms and present status. *South Med J.* 91(12):1115-20, 1998.
11. Takeshige, C., Murai, M., Sato, T. and Hishida, F. Parallel individual variations in effectiveness of acupuncture, morphine analgesia, and dorsal PAG-SPA and their abolition by D-phenylalanine. *Acupuncture and Electro-Therapeutics Res.* 5:251-68
12. Takeshige, C., Mera, H., Hisamitsu, T., Tanaka, M. and Hishida, F. Inhibition of the analgesia inhibitory system by D-phenylalanine and proglumide. *Brain Res Bull.* 26(3):385-91, 1991.
13. Pu, S., Zhuang, H., Lu, Z., Wu, X., Han, J. Cholecystokinin gene expression in rat amygdaloid neuron: normal distribution and effect of morphine tolerance. *Mol Brain Res.* 21(3-4):183-9, 1994.
14. Tang, N. M., Dong, H. W., Wang, X. M., Tsui, Z. C. and Han, J. S. Cholecystokinin antisense RNA increase the analgesic effect induced by electroacupuncture or low dose morphine: conversion of low responder rats into high responders. *Pain* 71(1):71-80, 1997.
15. Zhang, L. X., Li, X. L., Wang, L., Han, J. S. Rats with decreased brain cholecystokinin levels show increased responsiveness to peripheral electrical stimulation-induced analgesia. *Brain Res.* 745(1-2):158-64, 1997.
16. Zhou, Y., Luo, F. and Han, J. Enkephalinase inhibitors acetorphan and SCH34826 potentiate the analgesic effect of low frequency electroacupuncture in rats. *Chen Tzu Yen Chiu* 15(4):3310-4, 1990.
17. Dafny, N., Dong, W. Q., Prieto-Gomez, C., Reyes-Vazquez, C., Stanford, J. and Qiao, J. T. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience* 70(2):449-60, 1996.
18. Vidal, C. and Jacob, J. The effect of medial hypothalamus lesions on pain control. *Brain Res.* 199(1):89-100, 1980.
19. Gollub, R. L., Hui, K. K. and Stefano, G. B. Acupuncture: pain management coupled to immune stimulation. *Zhongguo YaoLi XueBao* 20(9):769-77, 1999.
20. 노삼용, 이기석, 이진우, 홍무창, 신민규, 민병일, 배현수. cDNA microarray를 이용한 침자극에 대한 반응군과 비반응군의 유전자적 특이성 연구. *동의생리병리학회지* 15(4):574-580, 2001.
21. 全國韓醫科大學校 鍼灸經穴學教室, 鍼灸學(上), pp.382-3, 集文堂, 서울, 1988.
22. 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(1):11-28, 1993.
23. Takeshige, C. Differentiation between acupuncture and non-acupuncture point by association with analgesia inhibitory system. *Acupuncture and Electro-Therapeutics Res.* 10:195-203, 1985.
24. Dourish, C. T. and Hill, D. R. Classification and function of CCK receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 8(6):207-8, 1987.
25. Takeshige, C., Sato, T., Mera, T., Hisamitsu, T. and Fang, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res Bull.* 29(5):617-34, 1992.
26. 위서성, 中醫痛症診療大典, pp.40-79, 중국중의약출판사, 북경, 1992.
27. 洪元植, 黃帝內經素問, pp.44, 188, 193, 200-1, 210, 221-2, 235, 305, 東洋醫學研究院, 서울, 1985.
28. 賈真榮, 金知赫, 黃義完. 痛症에 관한 小考. *동의신경과학회지* 3(2):107-26, 1992.
29. 李東垣, 東垣十種醫書, pp.303-4, 대성문화사, 서울, 1983.
30. 洪元植, 精校黃帝內經靈樞, pp.11, 23, 89, 102-4, 145, 163, 東洋醫學研究院, 서울, 1985.
31. 김창환, 고흥균, 최민섭. 수침요법(水鍼療法)에 관한 고찰. *대한침구학회지* 7(1):315-29, 1990.
32. 김종호. 전침의 통전시간이 진통효과에 미치는 영향. *대한한의학회지* 7:9-18, 1986.
33. 이상훈, 김성욱, 이윤호, 정병식, 조성규, 윤형석. 위중혈 자극의 요통에 대한 치료효과. *대한침구학회지* 19(1):65-75, 2002.
34. 신민규, 손낙원. 말초신경 절단상태에서의 침자극(鍼刺戟)이 진통에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. *동의학회지* 12(4):72-9, 1987.
35. 윤종화, 김갑성, 최윤석. Laser 침이 Carrageenin에 의해 유발된 백서(白鼠)의 족척(足蹠) 부종과 염증 치료 효과. *대한침구학회지* 13(1):55-65, 1996.
36. Research Group of Acupuncture Anesthesia, Peking medical College, The role of some neurotransmitters of the brain in finger-acupuncture analgesia, *Sci Sin.* 17:112, 1974.

37. Hughes, J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88(2):295-308, 1975.
38. Goldstein, A. Opioid peptides(endorphins) in pituitary and brain. *Science* 193(4258):1081-6, 1976.
39. Simantov, R., Goodman, R., Aposhian, D. and Snyder, S. H. Phylogenetic distribution of morphine-like peptide (enkephalin). *Brain Res.* 111(1):204-11, 1976.
40. Duggan, A. W., Hall, J. G. and Headley, P. M. Morphine, enkephalin and substantia gelatinosa. *Nature* 264(5585): 456-8, 1976.
41. Hokfelt, T., Jung, L., Terenius, L., Elde, R. and Nilsson, G. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 74(7):3081-5, 1977.
42. Gallager, D. W. and Pert, A. Afferents to brainstem nuclei (brainstem raphe, nucleus reticularis pontis caudalis and nucleus gigantocellularis) in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. *Brain Res.* 144(2):257-75, 1978.
43. Fields, H.L., Basbaum, A.I. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. *Annu Rev Physiol.* 40:217-48, 1978.
44. LeBars, D., Menetrey, D., Conseiller, C. and Besson, J. M. Depressive effects of morphine upon lamina V cells activities in the dorsal horn of the spinal cat. *Brain Res.* 98(2):261-77, 1975.
45. Willer, J. C. and Bussel, B. Evidence for a direct spinal mechanism in morphine-induced inhibition of nociceptive reflexes in humans. *Brain Res.* 187(1):212-5, 1980.
46. Kleinhenz, J. Acupuncture mechanisms, Indications and effectiveness according to recent western literature. *American journal of Acupuncture* 23(3):211-8, 1995.
47. 민병일, 김덕곤, 동양의학의 과학적 접근과 임상, pp.71-82, 149-51, 서원당, 서울, 1993
48. Baldry, P. E. *Acupuncture, trigger points and musculo-skeletal pain* 2nd ed., Churchill Livingstone, London, 1993.
49. Pomeranz, B., Chiu, D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. *Life sci.* 19(11):1757-62, 1976.
50. Mayer, D. J., Price, D. D. and Rafii, A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the tarconic antagonist naloxone. *Brain Res.* 121(2):368-72, 1977.
51. 백광세, 정진모, 남택상, 강두희. 말초신경자극이 동통반응에 미치는 영향. *대한생리학회지* 15:73, 1981.
52. 성낙기. 침침법을 중심으로 한 자극량과 침의 진통기전에 대한 임상적 고찰. *대전대학교 한의학연구소 한의학논문집* 3(1):151-6, 1994.
53. Mcdermid, A. J., Rollman, G. B. and McCain, G. A. Generalized hypervigilance in fibromyalgia: evidence of perceptual amplification. *Pain* 66(2-3):133-44, 1996.
54. 송종규, 임규상, 김경식. 침자가 만성요통의 혈장내 β -endorphin ACTH 및 Cortisol 함량에 미치는 영향. *대한침구학회지* 6(1):63-82, 1989.
55. Peters, M. L., Schmidt, A. J. Differences in pain perception and sensory discrimination between chronic low back pain patient and health controls. *Journal of psychosomatic Research* 36(1):47-53, 1992.
56. 현명호, 김청송. 재앙적 사고와 신경증적 경향성이 압통역치에 미치는 효과. *한국심리학회지* 3(1):169-78, 1998.
57. Feine, J. S., Bushnell, M. C., Miron, D. and Duncan, G. H. Sex differences in the perception of noxious heat stimuli. *Pain* 44(3):255-62, 1991.
58. 강형창, 김용익, 황경호, 광수달, 박욱, 김상열. 성인에서 전류에 의한 지각과 통각 역치간의 상관관계. *대한마취과학회지* 36:474-80, 1999.
59. 김양식, 최용태. 자침심도(刺鍼深度)에 관한 문헌적 고찰. *대한침구학회지* 4:105-16, 1987.
60. 정종훈, 김수관, 허영철. 동통조절. *구강생물화학연구* 21(2):83-103, 1997.