

원저

電鍼자극이 SHR 흰쥐의 Dentate Gyrus에서의 Doublecortin과 PSA-NCAM 양성 신경세포에 미치는 영향

우현수 · 이재동 · 김창환

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of electroacupuncture stimuli to the Doublecortin and PSA-NCAM positive cells in the Dentate Gyrus of spontaneously hypertensive rats

Woo Hyun-su, Lee Jae-dong and Kim Chang-hwan

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

Objective : This experimental in vitro study investigates the effects of electro acupuncture stimuli to the DCX and PSA-NCAM positive cells in the dentate gyrus of spontaneously hypertensive rats.

Methods : We used immunohistochemical methods to observe the change of neuron cells, and then counts the immunoactive cells under the 100× visual field optical microscope.

Results :

1. The counts of DCX-positive cells in the dentate gyrus significantly increased in the 2Hz group versus control group. Otherwise 100Hz group did not have a significant difference.
2. The counts of PSA-NCAM-positive cells in the dentate gyrus rather decreased in the both 2Hz group and 100Hz group versus control group

Conclusions : We find out the electroacupuncture stimuli have some effects upon cerebral neuron cells in the dentate gyrus of spontaneously hypertensive rats.

· 접수 : 2003년 1월 11일 · 수정 : 2003년 1월 11일 · 채택 : 2003년 1월 25일
· 교신저자 : 김창환, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 02-958-9192 E-mail : kchacu@khmc.or.kr

Key words : electroacupuncture(EA), doublecortin(DCX) PSA-NCAM, dentate gyrus, cell proliferation

I. 緒 論

鍼요법은 韓醫學에서 중요한 치료기술의 하나로, 일종의 刺戟療法으로서 통증을 비롯한 여러 증상을 완화시키고 항상성을 유지시키며, 질병을 예방하고 치료하는데 활용되어 왔다. 한의학에서鍼요법은 질병이 있는 장기 혹은 체내에서 연락과 조화의 전달 통로인 경락을 통해 작용된다고 생각하고 있다.

한편 서양의학에서는 많은 질환이 뇌에 의해 통제를 받는다고 알려져 있고, 최근에는 양전자방출단층촬영(PET), fMRI나 [¹⁴C]2-DG 자가방사능기록법 등의 영상기법을 이용하여鍼자극에 의한 뇌혈류변화나 대뇌피질의 활성화가 확인되고 있다.

이러한 연구들은鍼요법의 효과를 나타내는 기전에서 뇌의 작용이 관여함을 나타내어鍼요법이 중추신경계에 영향을 미친다는 것을 나타낸다고 볼 수 있으며^{1),2)}, 최근에는鍼자극시에 대뇌에서 신경세포의 증식이 활발히 이루어진다는 연구가 보고되기도 하였다³⁾.

뇌의 특정부위에서 일어나는 세포증식현상을 관찰할 수 있는 지표로서 최근에 연구가 활발히 진행되고 있는 대표적인 물질로는 DCX(doublecortin)과 PSA-NCAM(polysialyted form of the neural cell adhesion molecule)을 들 수 있다.

DCX는 신경이 유주하고 분화하여 피질화를 형성하는 과정에 걸쳐서 뇌에서 발현되는 단백질로서, 신경의 유주 및 발달에 관여하고 있다⁴⁾. 이 물질은 소뇌와 전뇌가 발달되는 초기단계에서 가장 많이

발현하는 것으로 알려져 있으며, 뇌덮개(tectum), 척수, 후근절과 같은 영역에서도 나타난다⁵⁾.

NCAM(Neural cell adhesion molecule)은 세포막에 결합하는 당단백질로서 세포와 세포, 세포와 세포의 기질간의 상호작용을 매개하는 물질이다⁶⁾. Polysialic acid는 음전하를 띠는 크고 긴 사슬의 형태의 동중중합체(homopolymer)로서 NCAM에 부착되어 세포간의 상호작용에서 modulator로서의 역할을 수행한다. 이러한 NCAM의 polysialylated form인 PSA-NCAM은 신경의 유주(migration)⁷⁾, 신경돌기(neurite)의 성장, 축삭의 연장과 속상수축(fasciculation)^{8),9)}, 시냅스의 형성¹⁰⁾, 유전인자의 발현과 같은 신경발달 과정에 영향을 미친다¹¹⁾.

현재까지 電鍼은 단순침에 비해 진통효과가 우수하다는 것이 실험적으로 증명되었고, 자극의 양을 객관적으로 조절할 수 있어 실험 및 임상에서 많이 응용되어 왔다.

최근 학계에서는 세포의 증식과 관련된 연구가 활발히 진행 중인데鍼자극시에 대뇌에서의 신경세포 증식이 활발해진다는 것은 보고되고 있으나 電鍼자극시에 대뇌의 신경세포변화에 대한 연구는 매우 드문 실정이다.

그러므로 본 논문에서는 電鍼이 대뇌에서의 신경세포 증식에 미치는 영향을 연구하기 위하여 SHR 흰쥐의 足三里穴에 서로 다른 주파수의 電鍼자극을 시행한 뒤 대뇌의 dentate gyrus에서의 DCX 및 PSA-NCAM에 면역반응을 나타내는 세포의 수를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗의 材料 및 方法

1. 동물 및 재료

1) 실험동물

체중 $325 \pm 25\text{g}$ 인 9주령 ± 1 주령의 spontaneously hypertensive rats (SHR)계 수컷 흰쥐 (SLC사, 한국)를 2주간 실험환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 실험재료

鍼은 길이 0.8mm, 직경 0.15mm의 stainless steel (정화침구사, 한국) 호침을 사용하였고, 전침기는 일본 Ito사 PG-7형 전침기를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군의 설정

대조군은 SHR의 足三里(ST36)에 단순 鍼 자극만을 가한 군으로 하고, 실험군은 2 groups으로 나누어 SHR의 足三里(ST36)에 저빈도 고강도(2Hz, 1mA)의 電鍼을 가한 군과 SHR의 足三里(ST36)에 고빈도 저강도(100Hz, 0.2mA)의 電鍼을 가한 군으로 구분하였다.

2) 혈위의 선정

실험 흰쥐의 체표상에서 인체의 足三里(ST36) 경혈에 상응하는 부위를 고¹²⁾의 골도 분촌법에 의거하여 취혈하였다.

3) 대조군에서의 鍼 자극과 실험군에서의 電鍼 자극

대조군에서는 수기 자극이 없이 체표상에 鍼을 삽입하는 단순침 자극만 시행하였고, 실험군에서의 電鍼 자극은 연속파, 직각파, 0.2ms duration으로 설정하

여, 자극의 강도는 2Hz군은 근육수축이 현저히 보일 정도의 고강도 자극(1mA)을 하였고, 100Hz군은 약간의 근육수축이 나타날 정도의 저강도 자극(0.2mA)을 하였다. 電鍼 자극은 격일간격으로 일정한 시간에 시행되었으며 1회 자극시 10분씩 총 10회의 자극을 하였다. 이때 통증을 억제하기 위해 zoletil 50(1 vial : zolazepam 125mg, tiletamin 125mg, Virbac, France) 2ml를 근육주사하여 약하게 마취하였다.

3. 조직처리

실험동물은 pentobarbital sodium(60mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 0.05 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액(4°C)을 10분간 관류시켰다. 이때 관류속도는 50~60ml/min이 되도록 하였다. 관류고정 후 각각 대뇌변연계와 뇌간부위를 적출하여 4~6mm 두께로 관상절개하여 동일한 고정액에 담가서 4°C에서 16시간 후 고정하였다. 후고정 다음에는 0.1 M PBS에 탄 20% sucrose 용액에 2~5일간 보관하였다. 보관된 조직의 관찰을 위하여 cryocut(Leica, Germany)을 이용하여 절단시켜 40 μm 두께의 연속 횡단절편을 제작하였고, 자른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하였다.

4. Doublecortin 및 PSA-NCAM의 면역조직화학적 염색

Doublecortin의 면역조직화학적 처리를 위해 storing solution에 보관된 조직절편 중에서 육안적으로 해마가 관찰되는 절편을 선택하여 PBS로 5분씩 3번 vibrating pad위에서 washing한 뒤 내재성 페록시다제를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H₂O₂ 용액에서 15분간 반응시킨 다음 PBS로 5분씩 3

번 washing한 후 goat anti-doublecortin(Santacruz)을 1 : 4,000으로 희석한 항체를 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 및 0.3% Triton X-100이 들어있는 1차 항체용액에 넣고 4℃에서 vibrating pad에 두고 overnight하였다. 1차 항체용액에서의 반응이 끝나면 조직을 PBS로 5분씩 3번 washing한 뒤 2차 항체용액(Vectastain-Elite kit의 biotinylated anti-goat IgG를 1 : 200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 다시 PBS로 5분씩 3번 washing한 후 ABC용액(Avidin-biotin-peroxidase complex용액/Vectastatin-Elite kit의 A용액 1 : 100, B용액 1 : 100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에 반응시켰다. 발색제로는 DAB용액(pH 7.6 상태에서 0.05M Tris 완충액에 0.02% 3, 3-diaminobenzidine tertahydrochloride(Sigma), 0.003% H₂O₂)을 사용하였다. 발색반응은 상온에서 3~5분간 시켰으며, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 5분씩 3번 washing하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후 alcohol 탈수를 거쳐 xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다.

PSA-NCAM의 면역조직화학적 처리는 DCX와 동일한 방법으로 incubation, 항체처리, 발색, 건조, 탈수, 투명화과정을 시행하되, antibody는 mouse anti-PSA-NCAM(BD pharmingen)을 사용하였다.

5. 조직의 관찰

해마의 dentate gyrus부위에서 DCX와 PSA-NCAM에 양성면역반응을 나타내는 신경세포의 수를 측정하기 위하여 광학현미경을 이용하였다. 100배율의 시야에서 1개의 field에서 관찰되는 신경세포의 수를 현미경을 통해 육안적으로 계측하였으며, dentate gyrus의 각 부위는 Paxinos와 Watson의 뇌부도(The rat brain atlas)¹³⁾에 기재된 bregma를

기준으로 하여 분류하였다.

6. 통계처리

실험결과는 SPSS 10.0 for Windows를 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차(Mean±Standard Error)로 나타내었고, 유의수준은 p<0.05로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 oneway-ANOVA와 Sheffe test 검정을 실시하였다.

III. 實驗成績

1. 電鍼자극에 따른 dentate gyrus에서의 DCX 양성신경 세포수의 변화

광학현미경을 이용하여 100배율 시야에서 DCX에 면역반응을 나타내는 세포수를 측정하여 대조군에서의 세포수와 비교한 결과, 2Hz 電鍼자극군에서는 세포수의 유의한 증가(p<0.05)가 관찰되었으나, 100 Hz 電鍼자극군에서는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 한편 서로 다른 電鍼자극군간의 비교에서는 2Hz 電鍼자극군이 100Hz 電鍼자극군에 비해 세포수의 유의한 증가(p<0.05)가 관찰되었다<Table 1>.

Table 1. The counts of DCX-positive cells in the dentate gyrus after each electroacupuncture stimuli

	Control	2 Hz	100 Hz
cell counts	29.80±0.78	39.83±1.44 ^{ab}	33.53±1.37

The Values are Mean±Standard Error(SE) of the cell counts in the dentate gyrus measured by 100× field of vision optical microscope.

^a: The mean difference of 2Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, p=0.000).

^b: The mean difference of 2Hz group versus 100Hz group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, p=0.002).

Table 2. The counts of DCX-positive cells along bregma sections in the dentate gyrus after each electroacupuncture stimuli(bregma section ; mm)

bregma section	Control	2 Hz	100 Hz
-2.8~-3.6	31.00±1.42	43.70±2.57 ^a	35.60±3.64
-3.8~-4.52	30.20±1.42	40.30±1.89 ^b	33.30±1.34
-4.80~-5.6	28.20±1.15	35.50±2.45 ^c	31.70±1.46

The Values are Mean±Standard Error(SE) of the cell counts measured by 100× field of vision optical microscope.

a, b, c : The mean difference of 2 Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, a : p=0.01, b : p=0.000, c : p=0.025)

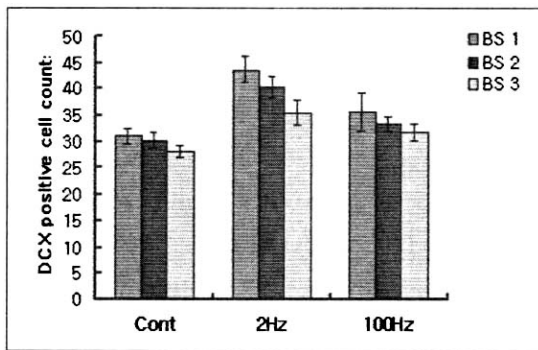


Fig. 1.

Dentate gyrus 영역을 Paxinos와 Watson의 뇌 부도(The rat brain atlas)¹³⁾에 기재된 bregma에 따라 보다 구체적으로 3단계로 나누어 관찰한 결과에서도 각각의 영역에서 대조군에 비해 2Hz 電鍼 자극군에서 세포수의 유의한 증가(p<0.05)가 관찰되었다<Table 2, Fig. 1>.

2. 電鍼자극에 따른 dentate gyrus에서의 PSA-NCAM 양성신경 세포수의 변화
광학현미경을 이용하여 100배율 시야에서 PSA-

Table 3. The counts of PSA-NCAM-positive cells in the dentate gyrus after each electroacupuncture stimuli

	Control	2 Hz	100 Hz
cell counts	4.37±0.32	2.10±0.30 ^a	2.67±0.29 ^b

The Values are Mean±Standard Error(SE) of the cell counts in the dentate gyrus measured by 100× field of vision optical microscope.

a : The mean difference of 2 Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, p=0.000).

b : The mean difference of 100 Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, p=0.001).

NCAM에 면역반응을 나타내는 세포수를 측정하여 대조군에서의 세포수와 비교한 결과, 2Hz 電鍼자극군과 100Hz 電鍼자극군 모두에서 세포수의 유의한 감소가 관찰되었다.(p<0.05) 한편 서로 다른 電鍼 자극군간의 비교에서 2Hz 電鍼자극군과 100Hz 電鍼자극군 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

Table 4. The counts of PSA-NCAM-positive cells along bregma sections in the dentate gyrus after each electroacupuncture stimuli(bregma section ; mm)

bregma section	Control	2 Hz	100 Hz
-2.8~-3.6	3.60±0.50	2.80±0.63	2.60±0.60
-3.8~-4.52	5.30±0.58	1.60±0.37 ^a	3.00±0.33 ^b
-4.80~-5.6	4.20±0.49	1.90±0.48 ^c	2.40±0.56

The Values are Mean±Standard Error(SE) of the cell counts measured by 100× field of vision optical microscope.

a, c : The mean difference of 2 Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, a : p=0.000, c : p=0.014).

b : The mean difference of 2 Hz group versus control group is significant at the $\alpha=0.05$ level(Scheffe's multiple comparisins, a : p=0.000, c : p=0.014).

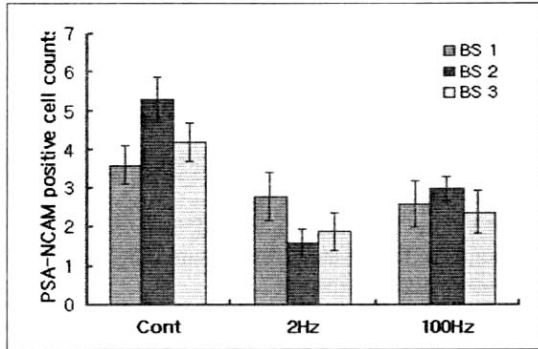


Fig. 2.

Dentate gyrus 영역을 Paxinos와 Watson의 뇌 부도(The rat brain atlas)¹³⁾에 기재된 bregma에 따라 보다 구체적으로 3단계로 나누어 관찰한 결과, 대부분의 영역에서 대조군에 비해 2Hz 電鍍자극군에서 세포수의 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었으며, 일부 영역에서는 대조군에 비하여 100Hz 電鍍자극군에서도 세포수의 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었다<Table 4, Fig 2>.

IV. 考 察

포유동물의 뇌는 지속적으로 신경전구세포를 생산하며 발달기에 걸쳐서 신경조직의 발생을 나타내게 된다¹⁴⁾. 지금까지 뇌에서의 세포 증식에 대한 연구에 따르면, 성장한 포유동물의 뇌에서는 일반적으로 제한된 구역, 즉 해마(hippocampus), 후각망울(olfactory bulb), 상피(epithelium)과 일부 macaque 원숭이 대뇌피질에서만 신경조직의 발생이 일어난다고 하였다¹⁵⁾. 그중에서 해마영역에 있는 치아이랑(dentate gyrus)에서의 세포의 출현과 신경 발생이 가장 활발하다는 것이 많은 연구들에서 증명

되어 왔다^{16),17)}. 성장한 동물의 dentate gyrus 부위에서 glucocorticoids, estrogen, N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 길항제, serotonin, aging, seizures, 환경요소의 자극 등이 과립세포전구체(granular cell precursors)의 증식이나 신경조직의 발생에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다^{18),19)}.

Dentate gyrus는 대뇌변연계의 피질부에서 해마체(hippocampal formation)를 이루는 구성요소로서 길고 폭이 좁은 결절상의 팽대를 이루며 해마구의 상벽에 위치한다²⁰⁾. 대뇌변연계는 신경계 안에서 감정, 본능적 충동(성욕·기아·충만감), 본능행동의 programming 등에 관여하는 요소의 전부를 함유하고 있으며, 자율신경계의 장기지배에 대해서도 조절적 영향을 미치고 있다. 해마체 부위는 소뇌와 함께 중추신경계 중에서 잘 알려진 영역으로 임상적으로 기억, 특히 짧은 시간동안의 기억에 관련된다. 이 부위에서의 신경섬유연락관계, 신경전달물질 그리고 특정 화학물질에 대한 국제적 분포에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다.

Dentate gyrus는 해마체에서 뇌량팽대부위를 돌아 배측방향으로 뻗쳐서 대뇌 회백층에까지 연속되어 있다. 또한 복측방향에서는 구와 해마방회 사이에 뻗쳐있어 구의 표면에 있는 Giacomini의 섬유대에 연속된다. Dentate gyrus는 다형(polymorphic), 과립형(granular), 분자형(molecular)의 3개의 층 구조를 가지며 특히 granular layer에서 신경세포의 활발한 증식이 이루어진다.

DCX는 전기적으로 10의 등전압 값을 가지는 기본단백으로, 전형적인 미세소관 결합영역의 인단백질(phosphoprotein)이다. 그러나 미세소관 결합영역의 서열에 대하여는 아직까지 알려진 바가 거의 없다²¹⁾. 이 물질은 방사상(放射狀)과 경사(傾斜)의 유주 신경모세포(migrating neuroblast)들이 널리 발현되고 있는 발달 중인 대뇌피질에서 정상적인 신경

의 유주에 필요한 단백질로서, olfactory bulb로 가는 신경전구세포(neuronal precursor)를 포함하는 전측유주류(rostral migratory stream)에서 관찰된다. 성장한 포유동물의 뇌에서는 일반적으로 제한된 구역에서 분화된 세포의 표현형을 나타내는 많은 세포들, 예를 들면 dentate gyrus의 과립층의 폐문부위에 나타나는 특정한 과립신경세포, pifiform cortex layer II에서의 몇몇 신경형, olfactory bulb에서 과립형이나 사구체형의 신경세포들, 선조체에서 독립된 세포들에서 DCX에 면역반응을 나타내었다²²⁾. DCX는 소뇌와 전뇌가 발달되는 초기단계에서 가장 많이 발현하는 것으로 알려져 있으며, 뇌덮개(tectum), 척수, 후근절과 같은 영역에서도 나타난다. 인간유전자의 변이(mutations)가 피질에서의 신경의 유주를 파괴시키므로, DCX는 대뇌피질에서 정상적인 신경의 유주에 필요한 물질이다. 異種에서 기원한 세포에서 DCX의 과도한 출현은 탈중합반응(depolymerization)에 저항하는 극적인 미세소관의 표현형을 유도하는 것으로 미루어, DCX는 미세소관의 조직화와 안정성을 조절함으로써 신경의 유주에 관여된다는 것이 알려져 있다²³⁾. DCX 유전자의 결손은 두 종류의 성염색체 관련 대립형질 장애인 성염색체 연관성 활택뇌(X-linked lissencephaly)와 중피질(double cortex)의 발생에 영향을 미쳐 간질이나 정신발달지연과 같은 증세를 초래한다²⁴⁾.

NCAM은 세포막에 결합하는 당단백질(glycoprotein)로서 세포와 세포, 세포와 세포외기질간의 상호작용을 매개하는 물질이다⁶⁾. NCAM은 발달기 동안에 highly sialylated forms(embryonic, E-NCAM)에서 180, 140, 120 kDa의 분자량을 나타내는 세가지 크기의 less sialylated forms으로 세포표면이 변화된다. 신경계에서 E-NCAM은 발달조직에 국한되어 있으며 신경군의 구성과 조직형의 결정에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. PSA-NCAM이 결핍된 해마에서는 뇌에서 기원한 신경영양인자(brain

-derived neurotrophic factor, BDNF)가 자기상승작용(long-term potentiation, LTP)을 회복시킨다는 것이 밝혀졌다²⁶⁾.

電鍼요법은 穴位에 刺鍼하여 감응이 있는 후에 鍼위에 전류를 통해서 수기법의 기계적인 자극에 대체하는 전기적 자극을 줌으로써 經絡穴位의 작용을 통하여 질병을 치료하는 新鍼療法 중의 하나이다²⁷⁾. 電鍼은 일반적으로 손으로 행해지는 지속적인 運鍼法을 대체할 수 있으며, 인력을 절약할 수 있고 비교적 자극량을 객관적으로 조절할 수 있다는 장점이 있어 동통질환, 마비질환 등 일반적인 刺鍼요법의 적응증에는 모두 응용되고 있으며, 신경통이나 마비질환 등 기능성 질환에 특히 효과적인 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

電鍼은 프랑스의 의사인 Louis Berlioz가 1816년에 鍼치료로 신경통을 치료하였다고 발표하면서 鍼에 전류를 통하게 하는 전기적인 자극을 穴位에 처치하면 일반적으로 사용하는 침술보다 높은 치료효과를 얻을 수 있다고 최초로 발표하였다. 이후 Sarlandiere가 1825년에 電鍼을 신경계통 질환에 사용하여 치료효과를 발표한 이후 근래에 이르러 임상에 폭넓게 응용되고 있다²⁹⁾.

電鍼療法은 자극의 주파수, 파형 및 자극시간에 따라 서로 다른 치료효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 그중에서 주파수의 차이에 특징을 살펴보면, Holmgren³⁰⁾은 주파수가 높으면 진통효과는 감소하고 근긴장은 억제되며, 주파수가 낮으면 진통효과는 증대하나 이에 따른 근긴장도 증대된다고 하였다. Pomeranz³¹⁾는 저빈도 자극(4Hz)은 내인성 opioid가 관여하여 일어나는 진통효과이며, 고빈도 자극(200Hz)은 serotonin계에 의해 일어난다고 발표하였다. 뿐만 아니라 저빈도 자극에 의해서 발현하는 진통효과는 자극이 있는 후에 서서히 발현하며, 자극이 끝난 후에도 일정한 기간동안 지속하는 양상을 나타내는 것으로 알려진다. 이러한 저빈도 자극에

의해 일어나는 진통효과는 내인성 opioid의 비선택적 길항제로 알려진 naloxone의 처치로 완전히 억제될 뿐만 아니라 뇌하수체를 실험적으로 제거한 실험동물에서는 진통효과가 발현되지 않는 것으로 보고되어 있어, 상위중추가 이들 저빈도 자극에 의한 진통효과의 발현기전에 관여하는 것으로 추정된다³²⁾.

한편 고빈도 자극에 의해 발현되는 진통효과는 발현양상이 빠를 뿐만 아니라 자극이 끝남과 동시에 소실되는 것으로 알려져 있으며, naloxone의 전처치로 완전히 길항되지 않는다. 그러므로 이러한 고빈도 자극에 의한 진통효과는 그 발현기전에 내인성 opioid성 물질이 관여하고 있지 않으며 다른 신경전달물질의 작용에 의해 일어나는 것으로 추정된다³³⁾.

電鍼의 빈도수에 따라 진통에 관여하는 기전이 다르다는 보고³⁴⁾ 이후 빈도수가 치료효과를 결정하는 중요한 인자가 될 수 있다는 견해에 따라 현재까지 통증기전에 관련된 電鍼연구는 활발히 진행되고 있다.

Han, Wang³⁵⁾ 등은 저빈도 電鍼자극(2Hz)은 중추신경계에서 naloxone에 의해 억제되는 δ 수용체와 μ 수용체에 반응하는 endomorphins, enkephalin, β -endorphin을 분비하고, 고빈도 電鍼자극(100Hz)은 척수에서 κ 수용체에 반응하는 dynorphin을 분비한다고 보고하였다. Cheng³⁶⁾과 Kwon³⁷⁾ 등은 고빈도 電鍼의 진통기전은 Dorsal Raphe로부터의 serotonin이 중요한 역할을 한다고 하였다. Guo³⁸⁾ 등은 電鍼자극 후 preproenkephalin(PPE), preprodynorphin(PPD) 및 peopiomela nocortin(POMC)의 opioid peptide를 coding하는 mRNA 발현을 관찰하여 PPE는 2Hz와 100Hz 電鍼자극군에서 모두 상승하였으나 2Hz 電鍼자극군이 더욱 효과적이었고, PPD는 100Hz 電鍼자극군에서만 현저히 증가하였고 POMC는 電鍼자극에 반응하지 않았다고 보고하였다. Shen³⁹⁾ 등은 spinal cord에서의 sub-

tance P를 관찰하여 저빈도(2Hz) 電鍼자극에서는 감소, 중빈도(15Hz)·고빈도(100Hz) 電鍼에서는 증가를 나타내었으며 저빈도 電鍼을 포함한 모든 substance P의 변화는 naloxone에 의해 억제되었다고 보고하였다.

足三里(ST36)는 현재까지 가장 많이 연구된 經穴 중의 하나로 補脾胃, 扶正培元, 祛邪防病 등의 穴性を 가지고 있으며²⁸⁾, 위장기능, 호흡기능, 혈액순환, 내분비계통, 뇌하수체-부신기능, 면역기능, 미량 원소에 대한 조절작용이 있다. 研究에 따르면 足三里는 afferent fiber가 분포 특성상 비경혈보다 더 수초화되고, 더 크고, 더 많은 A β 섬유를 가지고 있으며⁴⁰⁾, 足三里 電鍼자극시 특이적으로 뇌대사활성을 보인 곳은 감정상태와 음식섭취의 조절기능을 가진 세로토닌성 뉴런(serotonergic neuron)이 풍부한 내측솔기핵(median raphe nucleus), 강력한 진통효과를 가진 수도관주위백질(periaqueductal gray), 상하지의 떨림증세와 관련된 중재소뇌핵(interposed cerebellar nucleus), 청각신경로에서 음원의 외측상올리브핵(lateral superior olive) 및 배측와우신경핵(dorsal cochlear nucleus)이라고 하였다¹⁵⁾.

위에서 살펴본 바와 같이 기존의 電鍼 관련 論文들에서는 주로 電鍼의 진통기전에 관련된 연구를 위주로 진행되어 왔으며, 신경세포의 증식과 사멸의 과정에서 電鍼이 미칠 수 있는 영향에 대한 연구들은 거의 없는 실정이다.

본 論文에서는 電鍼자극이 대뇌에서의 신경세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 SHR 흰쥐의 足三里穴에 단순침, 2Hz, 100Hz의 서로 다른 자극을 준 다음 해마의 dentate gyrus 부위에서 DCX 및 PSA-NCAM에 면역반응을 나타내는 신경세포수를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

광학현미경을 이용하여 100배율 시야에서 DCX에 면역반응을 나타내는 세포수를 측정하여 대조군

에서의 세포수와 비교한 결과 2Hz 電鍼자극군에서 세포수의 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었으나, 100Hz 電鍼자극군에서는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 한편 서로 다른 電鍼자극군간의 비교에서는 2Hz 電鍼자극군이 100Hz 電鍼자극군에 비해 세포수의 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. Dentate gyrus 영역을 Paxinos와 Watson의 뇌부도(The rat brain atlas)¹³⁾에 기재된 bregma에 따라 보다 구체적으로 3단계로 나누어 관찰한 결과에서도 각각의 영역에서 대조군에 비해 2Hz 電鍼자극군에서 세포수의 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다.

한편 PSA-NCAM에 면역반응을 나타내는 세포수를 측정하여 대조군에서의 세포수와 비교한 결과, 2Hz 電鍼자극군과 100Hz 電鍼자극군 모두에서 세포수의 유의한 감소가 관찰되었다. ($p < 0.05$) 한편 서로 다른 電鍼자극군간의 비교에서 2Hz 電鍼자극군과 100Hz 電鍼자극군 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았다. Dentate gyrus 영역을 Paxinos와 Watson의 뇌부도(The rat brain atlas)¹³⁾에 기재된 bregma에 따라 보다 구체적으로 3단계로 나누어 관찰한 결과, 대부분의 영역에서 대조군에 비해 2Hz 電鍼자극군에서 세포수의 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었으며, 일부 영역에서는 대조군에 비하여 100Hz 電鍼자극군에서도 세포수의 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었다.

DCX와 PSA-NCAM은 모두 신경세포가 유주되고 분화하는 과정에서 필요로 하는 단백질로서 신경증식이 진행 중인 세포들의 존재를 나타내는 표지물질의 역할을 하기도 한다. 그러므로 이 두 물질에 면역반응을 나타내는 세포수의 증가는 곧 신경세포의 증식을 의미하게 된다.

위의 결과를 살펴보면 電鍼자극시에 DCX에 면역반응을 나타내는 세포수는 유의하게 증가하였으나 PSA-NCAM에 반응하는 세포수는 오히려 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다. DCX의 경우는 특

히 2Hz의 電鍼을 시행한 경우에 100Hz에 비해 유의한 증가가 관찰된 것으로 보아 저빈도 電鍼자극이 대뇌에서의 세포증식을 더욱 촉진한다는 것을 추측하여 볼 수 있었다. 한편 PSA-NCAM의 경우는 2Hz, 100Hz의 電鍼자극에서 모두 유의한 감소가 관찰되었는데, 신경의 유주 및 증식과 관련된 두 물질에서 서로 다른 결과가 측정된 것에 주목할 필요가 있다. 현재까지는 이 두 물질이 각각 세포증식의 어떠한 단계에서 작용하는지에 대한 연구가 아직 명확하게 드러난 것이 없어 상반된 결과의 해석에 어려움이 있지만 두 물질이 발현하는 시기 및 발현기전의 측면에서 향후 더욱 구체적인 연구가 필요하리라 사료된다.

이상의 결과로, 電鍼자극은 대뇌조직에서 해마의 dentate gyrus에서의 신경세포수의 변화에 일정한 영향을 미친다는 것을 살펴볼 수 있었다. 이는 電鍼자극이 대뇌에서의 신경세포의 증식에 관련하여 작용함으로써 앞으로 뇌혈관질환에서의 신경의 복구, 뇌의 노화 및 치매치료에 대한 적용 및 파킨슨병에서의 활용에 관련하여 연구가 진행될 수 있는 근거를 제시한 셈이다.

V. 結 論

電鍼자극이 대뇌에서의 신경세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 SHR 흰쥐의 足三里穴에 단순침, 2Hz, 100Hz의 서로 다른 자극을 준 다음 해마의 dentate gyrus에서 DCX 및 PSA-NCAM에 면역반응을 나타내는 신경세포수를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Dentate gyrus에서 DCX에 면역반응을 나타내는 세포수는 대조군과 비교하여 2Hz 電鍼자극군

에서 유의한 증가를 나타내었고, 100Hz 電鍼 자극군에서는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

2. Dentate gyrus에서 PSA-NCAM에 면역반응을 나타내는 세포수는 대조군과 비교하여 2Hz, 100Hz 電鍼 자극군 모두에서 유의한 감소를 나타내었다

IV. 參考文獻

1. 손영주, 원란, 정혁상, 김용석, 박영배, 손낙원. 電鍼 자극에 의한 흰쥐 중추신경계내 대사활성 변화의 영상화 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18 (3) : 56-68.
2. Cho Z.H., Chung S.C., Jones J.P., Park J. B., Park H.J., Lee H.J., Wong E.K., Min B.I.. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. P NAS. US A. 1998 ; 95 : 2670-3.
3. Kim EH., Kim YJ., Lee HJ., Huh YB., Chung JH., Seo JC., Kang JE., Lee HJ., Yim SV., Kim CJ. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in grbils. Neurosci. Lett. 2001 ; 297 : 21-4.
4. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vine MC, Friocout G, Mc Donnell N, Reiner O, Kahn A, McConnel S K, Berwald-Netter Y, Donoulet P, Chelly J. Doublecortin is a develop mentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. Neuron 1999 ; 23(2) : 247-56.
5. Hannan A.J., Henke R.C., Seeto G.S., Capes-Davis A, Dunn J, Jeffrey PL. Expression of doublecortin correlates with neuronal migration and pattern formation in diverse regions of the developing chick brain. J. Neurosci Res 1999 ; 55(5) : 650-7.
6. U. Rutishauser, L. Landmesser. Polysialic acid in the vertebrate nervous system : a promotor of plasticity in cell-cell interactions. Trends Neurosci. 1996 ; 169 : 422-7.
7. K. Ono, H. Tomaszewicz, T. Magnusson, U. Rutishauser. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. Neuron. 1994 ; 13 : 595-609.
8. P. Doherty, M. Fruns, P. Seaton, G. Dickson, C.H. Barton, T.A. Sears, F.S. Walsh. A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. Nature. 1990 ; 343 : 464-6.
9. H. Zhang, R.H. Miller, U. Rutishauser. Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. J. Neurosci. 1992 ; 12 : 3107-14.
10. P.D. Miller, S.D. Styren, C.F. Lagenaur, S.T. DeKosky. Embryonic N-CAM is elevated in the denervated rat dentate gyrus. J. Neurosci. 1994 ; 14 : 4217-25.
11. J. Nacher, G. Alonso-Llosa, Daniel Rosell, Bruce McEwen. PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist ad-

- ministration. *Brain Research* 2002 ; 927 : 111-21.
12. 고희균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈위. 대한침구학회. 1999 ; 16(3) : 115-22.
 13. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd Edition. Academic Press, San Diego, CA. 1997.
 14. Altman J., Bayer S.A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 1990 ; 301 : 365-381.
 15. S. S. Magavi, B. R. Leavitt, J. D. Macklis. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 2000 ; 405 : 951-5.
 16. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H.. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, 1998 ; 4 : 1313-1317.
 17. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A.J., Shors, T.J.. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.*, 1999 ; 2 : 260-265.
 18. Fuchs, E., Gould, E. In vivo neurogenesis in the adult brain regulation and functional implications. *Eur. J. Neurosci.* 2000 ; 12 : 2211-14.
 19. Kempermann, G. Kuhn, H. G., Gage, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 ; 386 : 493-5.
 20. 신문균, 김본원, 김진상, 김현주, 이한기, 이해자. *임상신경해부학*. 현문사. 291-313.
 21. Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet.* 1999 ; 8(9) : 1599-610.
 22. Juan Nacher, Carlos Crespo and Bruce S. McEwen. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Our. J. of Neurosci.* 2001 ; 14 : 629-44.
 23. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and expressed widely by migrating neurons. *Neuron.* 1999 ; 23(2) : 257-71.
 24. Golden JA. Cell migration and cerebral cortical development. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001 ; 27(1) : 22-8.
 25. Le Gal La Salle G, Rougon G, Valin A. The embryonic form of neural cell surface molecule(E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus. *J Neurosci.* 1992 ; 12(3) : 872-82..
 26. D. Muller, Z. Djebbara-Hannas, P. Jourdain, L. Vutskits, P. Durbec, G. Rougon, J. Z. Kiss. Brain-derived neurotropic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *PNAS.* 2000 ; 97(8) : 4315-20.
 27. 최용태 외 공저. *최신침구학*. 서울. 정보사. 1991 : 264, 396-404.
 28. 전국한의과대학 침구경혈학교실. *침구학(상)*. 서울. 집문당. 1994 ; 38 2-4.
 29. 김재규 외 공저. *電鍼치료의 이론과 임상*. 서울. 서원당. 1993 : 14-7.

30. Holmgren E. Increase of pain threshold as a function of conditioning electrical stimulation. An experimental study with application to electro-acupuncture for pain suppression. *Am J Chin Med.* 1975 ; 3(2) : 133-42.
31. Cheng RS, Pomeranz B. Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms ; endorphin and non-endorphin systems. *Life Sci.* 1979 ; 25(23) : 1957-62.
32. Pomeranz B, Cheng R, Law P. Acupuncture reduces electrophysiological and behavioral responses to noxious stimuli : pituitary is implicated. *Exp Neurol.* 1977 ; 54(1) : 172-8.
33. Bing Z, Villanueva L, Le Bars D. Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls : naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons. *Neuroscience.* 1990 ; 37(3) : 809-18.
34. He LF, WQ Dong, MZ Wang. Effects of iontophoretic etorphine and naloxone and electroacupuncture on nociceptive responses from thalamic neurons in rabbits. *Pain.* 1991 ; 44 : 89-95.
35. Han Z, Jiang YH, Wan Y, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100Hz electroacupuncture analgesia in the rat. *Neurosci Lett.* 1999 ; 274(2) : 75-8.
36. Cheng RS, Pomeranz B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. *Brain Res.* 1981 ; 215(1-2) : 77-92.
37. Kwon YB, Kang MS, Son SS, Kim JT, Lee YH, Han HJ, Lee JH. Different frequencies of electroacupuncture modified the cellular activity of serotonergic neurons in brainstem. *Am J Chin Med.* 2000 ; 28(3-4) : 435-41.
38. Guo HF, Tian J, Wang X, Fang Y, Hou Y, Han J. Brain substrates activated by electroacupuncture of different frequencies (I) : Comparative study on the expression of oncogene c-fos and genes coding for three opioid peptides. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996 ; 43(1-2) : 157-66.
39. Shen S, Bian JT, Tian JB, Han JS. Frequency dependence of substance P release by electroacupuncture in rat spinal cord. *Sheng Li Xue Bao.* 1996 ; 48(1) : 89-93.
40. Guo WL. Characteristics afferent fiber innervation on acupuncture points zusanli. *Am. J. Physiol.* 1983 ; 245 : 606-12.